(19) **Bundesrepublik Deutschland**
Deutsches Patent- und Markenamt

(10) **DE 696 26 205 T2** 2004.02.12

(12) # Übersetzung der europäischen Patentschrift

(97) **EP 0 837 701 B1**
(21) Deutsches Aktenzeichen: **696 26 205.3**
(86) PCT-Aktenzeichen: **PCT/US96/10377**
(96) Europäisches Aktenzeichen: **96 922 473.2**
(87) PCT-Veröffentlichungs-Nr.: **WO 96/040297**
(86) PCT-Anmeldetag: **07.06.1996**
(87) Veröffentlichungstag der PCT-Anmeldung: **19.12.1996**
(97) Erstveröffentlichung durch das EPA: **29.04.1998**
(97) Veröffentlichungstag der Patenterteilung beim EPA: **12.02.2003**
(47) Veröffentlichungstag im Patentblatt: **12.02.2004**

(51) Int Cl.[7]: **A61L 2/08**
A61L 27/00

(30) Unionspriorität:
478452 **07.06.1995** **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

(74) Vertreter:
Patentanwälte Wallach, Koch & Partner, 80339 München

(72) Erfinder:
TUCKER, M., Marjorie, Holliston, US; RUEGER, C., David, Hopkinton, US; SAMPATH, T., Kuber, Medway, US

(54) Bezeichnung: **TERMINAL-STERILISIERTE OSTEOGENE VORRICHTUNGEN UND IHRE HERSTELLUNG**

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

Technisches Gebiet der Erfindung

[0001] Diese Erfindung betrifft im Allgemeinen das Gebiet der osteogenetischen Vorrichtungen und betrifft insbesondere terminal sterilisierte osteogenetische Vorrichtungen, die dazu in der Lage sind, nach einer Implantation in ein Säugetier eine Knochenbildung zu induzieren.

Ausgangspunkt der Erfindung

[0002] Therapeutische Vorrichtungen und insbesondere osteogenetische bzw. knochenbildende Vorrichtungen werden typischerweise vor der Implantation in einen vorgesehenen Empfänger sterilisiert. Die Sterilisation ist erforderlich um sicherzustellen, dass die Vorrichtungen keine potentiellen Pathogene oder andere biologisch infektiöse Mittel in den vorgesehenen Empfänger einbringen. Knochenbildende Vorrichtungen, die ein knochenbildendes bzw. osteogenes bzw. osteogenetisches Protein in Kombination mit einem unlöslichen Trägermaterial umfassen, sind zur Induktion einer Knochenbildung an einem vorher gewählten Ort von Nutzen, beispielsweise an der Stelle einer Knochenfraktur in einem Säugetier. Bis jetzt wurden das Trägermaterial und das knochenbildende Protein typischerweise getrennt sterilisiert und wurden dann zur Erzeugung einer sterilen implantierbaren Vorrichtung kombiniert. Dieses Verfahren jedoch kann die Sterilität der sich ergebenden Vorrichtung nicht garantieren.

[0003] Das am meisten erwünschte Verfahren zur Sterilisierung einer Vorrichtung, die zwei oder mehrere Bestandteile umfasst, besteht in einem Verfahren, dass in der Technik als „terminale Sterilisation" bezeichnet wird. Durch dieses Verfahren wird die Vorrichtung im Anschluss an die Formulierung bzw. Zubereitung sterilisiert, d. h. nachdem alle Bestandteile miteinander in der Vorrichtung kombiniert wurden. Eine Vielzahl physikalischer und chemischer Verfahren wurde zur Verwendung in der terminalen Sterilisation entwickelt und schließen beispielsweise eine Exposition gegenüber Chemikalien oder Hitze bzw. Wärme oder eine Exposition gegenüber einer ionisierenden oder nicht ionisierenden Strahlung ein. Diese Verfahren können jedoch ihnen eigene Probleme aufweisen.

[0004] Beispielsweise können die chemischen Reagenzien, die bei der chemischen Sterilisation von Nutzen sind oder die Reaktionsnebenprodukte für den beabsichtigten Empfänger gefährlich sein. Demgemäß müssen die Chemikalien vor der Implantation der Vorrichtungen entfernt werden. Ethylenoxid und Formaldehyd sind Reagenzien, die üblicherweise als Sterilisationsreagenzien verwendet werden. Jedoch sind beide Alkylierungsmittel und können deswegen biologisch aktive Moleküle modifizieren und inaktivieren. Zusätzlich sind diese beiden Chemikalien Karzinogene und Mutagene (Davis et al., (1973) „Microbiology, 2. Ausgabe", Harper and Row, Publishers). In ähnlicher Weise ist, wo die Vorrichtung ein biologisch aktives Protein erfordert, ein Exponieren der Vorrichtung gegenüber erhöhten Temperaturen nicht wünschenswert, weil die Proteine denaturiert und anschließend durch Exposition gegenüber Hitze inaktiviert werden können. Obwohl die Sterilisation von Objekten durch Exposition gegenüber einer ionisierenden und nicht ionisierenden Strahlung die Notwendigkeit des Zusetzens potentiell toxischer Chemikalien umgeht, sind die Strahlungsenergie und/oder ihre Nebenprodukte, einschließlich freier Sauerstoffradikale dazu fähig, die Proteinkonformation zu modifizieren und können so das Protein schädigen oder inaktivieren. Zusätzlich kann die Exposition einiger medizinisch bedeutender Polymere, beispielsweise von Polyurethan oder Polymethylmethacrylat eine physikalische Sofort- und Langzeitveränderung des Polymers mit sich bringen.

[0005] Es ist deswegen eine Aufgabe dieser Erfindung, eine terminal sterilisierte knochenbildende Vorrichtung bereitzustellen, die, wenn sie an einen vorher ausgewählten Ort in einem Säugetier implantiert wird, zur Produktion von Knochen an diesem Ort in der Lage ist. Es ist eine weitere Aufgabe, ein allgemeines Verfahren zum terminal Sterilisieren osteogenetischer bzw. knochenbildender Vorrichtungen ohne Beeinträchtigung der biologischen Aktivität und/oder der Biokompatibilität der Vorrichtung bereitzustellen. Es ist eine weitere Aufgabe der Erfindung, ein Verfahren zum Induzieren der Knochenbildung an einem vorher ausgewählten Ort in einem Säugetier bereitzustellen, unter Verwendung einer terminal sterilisierten Vorrichtung der Erfindung.

[0006] Diese und weitere Aufgaben und Merkmale der Erfindung werden aus der Beschreibung, den Zeichnungen und den Ansprüchen, die folgen, erkennbar werden.

Zusammenfassung der Erfindung

[0007] Es wurde nunmehr entdeckt, dass terminal sterilisierte therapeutische Vorrichtungen, insbesondere eine knochenbildende Vorrichtung, die ein biologisch aktives Protein umfasst, beispielsweise ein knochenbildendes Protein in Kombination mit einem unlöslichen Trägermaterial, wenn es durch Exposition gegenüber ionisierender Strahlung sterilisiert wird, zur Induktion einer Knochen- und/oder Knorpelbildung in der Lage ist, wenn es einem Säugetier implantiert wird. Diese Erkenntnis ist unerwartet, weil bekannt ist, dass eine Exposi-

tion biologisch aktiver Proteine gegenüber einer ionisierenden Strahlung eine chemische Modifikation und Inaktivierung des Proteins zur Folge haben kann.

[0008] Gemäß einem ersten Grundgedanken stellt die vorliegende Erfindung ein Verfahren zur Erzeugung einer terminal sterilisierten knochenbildenden Vorrichtung zur Implantation in ein Säugetier bereit, das die folgenden Schritte umfasst:

a) Bereitstellen einer knochenbildenden Vorrichtung in einer luftarmen bzw. von Luft abgereicherten Umgebung, die in Kombination ein unlösliches Polymerträgermaterial und ein isoliertes, biologisch aktives knochenbildendes Protein umfasst, das zur Induktion einer Ersatzknochenbildung oder Gelenkknorpelbildung in der Lage ist, wenn es einem Säugetier implantiert wird; und

b) Aussetzen der knochenbildenden Vorrichtung aus Schritt a) einer ionisierenden Strahlung in einer Menge, die zur Sterilisierung der Vorrichtung ausreichend ist, während die biologische Aktivität des Proteins aufrecht erhalten wird, so dass eine terminal sterilisierte knochenbildende Vorrichtung erzeugt wird, die zur Induktion einer Ersatzknochenbildung oder einer Gelenkknorpelbildung in dem Säugetier in der Lage ist.

[0009] Bei einem zweiten Grundgedanken stellt die vorliegende Erfindung die Verwendung einer terminal sterilisierten osteogenetischen Vorrichtung zum Induzieren einer Ersatzknochenbildung oder Gelenkknorpelbildung an einem vorher ausgewählten Ort in einem Säugetier bereit, wobei die terminal sterilisierte knochenbildende Vorrichtung in Kombination ein unlösliches Polymerträgermaterial und ein isoliertes, biologisch aktives knochenbildendes Protein umfasst, das zum Induzieren einer Ersatzknochenbildung in der Lage ist, wenn es einem Säugetier implantiert wird, wobei die Vorrichtung durch Exposition gegenüber ionisierender Strahlung in einer luftarmen bzw. von Luft abgereicherten Umgebung sterilisiert wird.

[0010] Gemäß einem dritten Grundgedanken stellt die vorliegende Erfindung eine terminal sterilisierte knochenbildende Vorrichtung bereit, die in Kombination ein unlösliches Polymerträgermaterial und ein isoliertes biologisch aktives knochenbildendes Protein umfasst, das zum Induzieren einer Ersatzknochen- bzw. endochondralen Knochenbildung oder Gelenkknorpelbildung in der Lage ist, wenn es einem Säugetier implantiert ist, wobei die Vorrichtung durch Exposition gegenüber einer ionisierenden Strahlung in einer luftarmen Umgebung sterilisiert wird.

[0011] Der Begriff „knochenbildende bzw. osteogenetische Vorrichtung" wie hierin verwendet, betrifft jede Vorrichtung mit der Fähigkeit eine Knochenbildung zu induzieren, wenn sie einem Säugetier implantiert wurde. Die hierin beschriebene Vorrichtung ist ebenfalls dazu in der Lage, eine Gelenkknorpelbildung zu induzieren, wenn sie in einem Säugetier an einer avaskulären bzw. gefäßlosen Stelle implantiert wird, wie beispielsweise an der Oberfläche von subchondralem Knochen in einer synovialen bzw. echten Gelenkumgebung. Wie hierin verwendet, betrifft der Begriff „Knochen" ein calcifiziertes (mineralisiertes) Bindegewebe, das in erster Linie eine Zusammensetzung aus abgelagertem Calcium und Phosphat in Form von Hydroxyapatitkollagen (vorwiegend Typ I Kollagen) und Knochenzellen wie beispielsweise Osteoblasten, Osteozyten und Osteoklasten, ebenso wie das Knochenmarksgewebe umfasst, das sich im Inneren von echtem Ersatzknochen bildet.

[0012] Wie hierin verwendet betrifft der Begriff „Knorpel" einen Typ von Bindegewebe, der in ein extrazelluläres Netzwerk eingebettete Knorpelzellen enthält, die Kollagenfibrillen (in erster Linie Typ II Kollagen zusammen mit anderen kleineren Typen, beispielsweise Typ IX und XI), verschiedene Proteoglykane (beispielsweise Chondroitinsulfat, Keratansulfat und Dermatansulfat-Proteoglykane), andere Proteine und Wasser umfassen. „Gelenkknorpel" betrifft Hyalin oder Gelenkknorpel, ein avaskuläres, nicht mineralisiertes Gewebe, das die ein Gelenk bildenden Oberflächen von Knochen in Gelenken bedeckt und die Bewegung in Gelenken ohne direkten Knochen-zu-Knochen-Kontakt ermöglicht und dadurch einen Verschleiß und eine Schädigung der gegenüberliegenden Knochenoberflächen verhindert. Der größte Teil des normalen gesunden gelenkbildenden Knorpels wird als „Hyalin" bezeichnet, das eine charakteristische Milchglaserscheinung aufweist. Unter physiologischen Bedingungen verbleibt ein gelenkbildendes Knorpelgewebe auf der darunter liegenden mineralisierten Knochenoberfläche, dem subchondralen Knochen, der in hohem Maße vaskularisierte Knöchelchen enthält. Diese hoch vaskularisierten Knöchelchen können diffusionsfähige Nährstoffe an den darüber liegenden Knorpel, jedoch nicht an mesenchymale Stammzellen bereitstellen.

[0013] Wie hierin verwendet bedeutet der Begriff „knochenbildendes Protein" jedes Protein, das dazu in der Lage ist, eine Entwicklungskaskade zellulärer Ereignisse, die eine Ersatzknochenbildung zur Folge haben, zu produzieren, wenn es einem Säugetier implantiert wird. Die während der Ersatzknochendifferenzierung auftretende Entwicklungskaskade besteht aus einer Chemotaxis von mesenchymalen Zellen, einer Proliferation von Vorläuferzellen zu Knorpelzellen und Osteoblasten, einer Differentiation von Knorpel, einer vaskulären Invasion, Knochenbildung, Umformung und zuletzt aus der Markdifferenzierung. Echte knochenbildende Faktoren, die zur Induktion der oben beschriebenen Kaskade von Ereignissen in der Lage sind, die die Ersatzknochenbildung zur Folge haben, wurden nunmehr identifiziert, isoliert und kloniert. Diese Proteine, die in der Natur als Disulfid-verbrückte dimere Proteine auftreten werden in der Technik als „knochenbildende" Proteine, „osteoinduktive" Proteine und „knochenmorphogenetische" Proteine bezeichnet. Ein knochenbildendes Protein kann beispielsweise irgendeines der bekannten morphogenetischen Knochenproteine und/oder Äquivalente hiervon

sein, die hierin und/oder in der Technik beschrieben sind und schließt Material aus natürlicher Quelle, rekombinantes Material und irgendein Material ein, das in anderer Weise produziert wurde, das zum Induzieren einer Gewebsmorphogenese in der Lage ist. Osteogenetisches Protein, wie es hierin definiert ist, ist ebenfalls dazu in der Lage, eine Gelenkknorpelbildung in einem geeigneten avaskulären Ort in vivo zu induzieren.

[0014] Wie hierin verwendet soll der Begriff „Trägermaterial" ein Material mit Zwischenräumen bzw. Interstitien zur Anlagerung, Proliferation und Differentiation von infiltrierenden Zellen bedeuten. Es ist in vivo biologisch abbaubar bzw. biodegradierbar und es ist biokompatibel. Das heißt, es ist ausreichend frei von antigenen Stimuli bzw. Reizen, die eine Transplantatabstoßung zur Folge haben können. Der Träger umfasst vorzugsweise ein unlösliches Material und ist weiter so formuliert, so dass er eine Form und Dimension aufweist, die, wenn er implantiert wird, diejenige des Ersatzknochens oder Knorpelgewebes, das erwünscht ist, nachahmt. Der Träger kann weiterhin Reste umfassen, die für das zersetzende Gewebe spezifisch sind und/oder vom selben Gewebstyp abgeleitet bzw. gewonnen sind.

[0015] In einer bevorzugten Ausführungsform liegt das Gewichtsverhältnis von knochenbildendem Protein zu Trägermaterial vorzugsweise im Bereich von ungefähr 1 : 1 bis ungefähr 1 : 250.000 (beispielsweise von ungefähr 1 mg Protein : 1 mg Träger bis ungefähr 4 ng Protein : 1 mg Träger) und am meisten bevorzugt im Bereich von ungefähr 1 : 40 bis ungefähr 1 : 50.000 (beispielsweise von ungefähr 25 µg Protein : 1 mg Träger bis ungefähr 20 ng Protein : 1 mg Träger).

[0016] In einer Ausführungsform ist die ionisierende Strahlung ein Elektronenstrahl. In einer anderen Ausführungsform ist Gammastrahlung die bevorzugte Quelle der ionisierenden Strahlung. Es wird erwägt, dass jede herkömmliche Gammastrahlung- oder Elektronenstrahl-produzierende Vorrichtung in der Ausübung der Erfindung oder Elektronenstrahl-Produzierende Vorrichtung in der Ausübung der Erfindung verwendet werden kann. Darüber hinaus wird die bevorzugte Dosierung der ionisierenden Strahlung im Bereich von ungefähr 0,5 bis ungefähr 4,0 Megarad bereitgestellt und liegt am meisten bevorzugt im Bereich von ungefähr 2,0 bis ungefähr 3,5 Megarad, die Dosierungen darstellen, die ausreichend sind, um die von der FDA erforderten Sterilitätssicherheitsniveaus von 10^{-6} für die hierin beschriebenen Vorrichtungen zu erzeugen. Die zur Gewinnung eines Sterilitätssicherheitsniveaus von 10^{-6} für eine spezielle Vorrichtung erforderlichen Dosierungen können jedoch aus den „Association for the Advancement of Medical Instrumentation Guidelines", veröffentlicht 1992 bestimmt werden, deren Offenbarung hierin durch Bezugnahme mit aufgenommen ist.

[0017] In einer anderen Ausführungsform umfasst das unlösliche Trägermaterial poröses Material, das weiter ein teilchenförmiges Material sein kann. Die Poren weisen vorzugsweise Dimensionen auf, die ausreichend sind, um das Eintreten und die anschließende Differentiation und Proliferation migratorischer Vorläuferzellen in den Matrices zu ermöglichen. Alternativ kann das unlösliche Trägermaterial durch enges Packen des teilchenförmigen Materials in eine Form hergestellt werden, die für eine beabsichtigte Verwendung in vivo geeignet ist, beispielsweise beim Überspannen von Knochendefekten. Die porösen Teilchen oder gepackten Teilchen weisen vorzugsweise eine Teilchengröße im Bereich von ungefähr 70 bis ungefähr 850 µm auf und am meisten bevorzugt im Bereich von ungefähr 125 bis 450 µm. In einer anderen Ausführungsform wird das Trägermaterial als Teil einer Gelenkknochenvorrichtung formuliert. Die Vorrichtung kann aus entvitalisiertem Knorpelgewebe oder aus inertem, nicht mineralisiertem Matrixmaterial und knochenbildendem Protein gebildet werden und die Vorrichtung kann dann auf die subchondrale Knochenoberfläche als eine Folie bzw. ein Blatt aufgelegt werden. Alternativ kann eine formulierte Vorrichtung pulverisiert oder in anderer Weise mechanisch abgeschliffen bzw. abgerieben werden, um Teilchen zu produzieren, die wie hierin beschrieben zu einer Paste oder Gel zur Aufbringung auf die Knochenoberfläche formuliert werden können.

[0018] Das unlösliche Trägermaterial kann ein Polymer auf Nicht-Proteinbasis, beispielsweise ein synthetisches Polymer umfassen, das Polymilchsäure, Polybuttersäure, Polyglykolsäure und/oder Mischungen hiervon umfasst; und/oder ein oder mehrere natürlich gewonnene Moleküle, beispielsweise Hydroxyapatit, Tricalciumphosphat, Kollagen und Gemische hiervon. Kollagen ist gegenwärtig ein bevorzugtes Trägermaterial. Eine Person mit durchschnittlichem Fachkönnen auf dem Gebiet kann durch vernünftige Auswahl natürlicher und/oder synthetischer Materialien Polymermatrizes erzeugen, die die erwünschten physikalischen und chemischen Eigenschaften in vivo aufweisen. Beispielsweise kann autologes Kollagen mit synthetischen Polymeren, einschließlich Copolymeren, gemischt werden, um eine Matrix mit einer erhöhten in vivo Biodegradationsgeschwindigkeit zu erzeugen und/oder die bevorzugten Behandlungsqualitäten, die die Vorrichtung der Erfindung während der Implantation einfacher zu behandeln machen, zu verbessern. Beispielsweise kann eine teilchenförmige, Kollagen enthaltende Vorrichtung mit einem oder mehreren Bestandteilen kombiniert werden, die zur Bindung der Teilchen in einer pastenartigen oder gelartigen Substanz dienen. Bindungsmaterialien die in der Technik wohl charakterisiert sind, schließen beispielsweise Carboxymethylzellulose, Glycerol, Polyethylenglykol und dergleichen ein. Alternativ kann die Vorrichtung osteogenetisches Protein umfassen, das in einer synthetischen Matrix dispergiert ist, die die erwünschten physikalischen Eigenschaften bereitstellt.

[0019] Das knochenbildende Protein, das in den Verfahren und Vorrichtungen der Erfindung von Nutzen ist, gleichgültig ob natürlich vorkommend oder synthetisch hergestellt, ist dazu in der Lage, die Rekrutierung zugänglicher Vorläuferzellen zu induzieren und deren Proliferation zu stimulieren, die Differenziation zu Knorpel-

zellen und Osteoblasten zu induzieren und weiter die Differenziation von Zwischen-Knorpel, die Vaskularisation, Knochenbildung, Umformung und zuletzt die Markbildung zu induzieren, wenn es in ein Säugetier implantiert wird. Das Protein ist ebenfalls dazu in der Lage, die Bildung von neuem Gelenkknorpelgewebe auf einer subchondralen Knochenoberfläche zu induzieren, wenn es in einer geeigneten lokalen Umgebung bereitgestellt wird.

[0020] Bevorzugte knochenbildende Proteine schließen beispielsweise Homo- oder Heterodimere von OP-1, OP-2, BMP-2, BMP-3, BMP-4, BMP-5, BMP-6 oder funktionelle Äquivalente hiervon ein. Diese Proteine werden in der Technik als Mitglieder der „Vg/dpp" Proteinunterfamilie der TGF-β Supergenfamilie bezeichnet.

[0021] Bei einem anderen Grundgedanken stellt die Erfindung ein Verfahren zum Induzieren der Knochenbildung und/oder der Gelenkknorpelbildung in einem Säugetier bereit. Das Verfahren umfasst die Schritte, (a) eine terminal sterilisierte Vorrichtung gemäß der Erfindung an einem vorher ausgewählten Ort in das Säugetier zu implantieren und (b) zu ermöglichen, dass die Vorrichtung die geeignete Gewebsbildung in dem vorher ausgewählten Ort induziert.

[0022] Bei einem anderen Grundgedanken stellt die Erfindung ein allgemeines Verfahren zur Erzeugung einer terminal sterilisierten knochenbildenden Vorrichtung bereit, die zur Implantation in ein Säugetier geeignet ist. Das Verfahren umfasst die Schritte (a) ein biologisch aktives knochenbildendes Protein bereitzustellen; (b) das knochenbildende Protein mit einem unlöslichen Trägermaterial zu kombinieren; und (c) die Kombination gegenüber ionisierender Strahlung in einer Menge zu exponieren, die ausreichend ist, um die Kombination terminal zu sterilisieren, während die biologische Aktivität des Proteins aufrecht erhalten bleibt. Das Verfahren ist schnell, und sanft und wird unter Verwendung herkömmlicher Bestrahlungsvorrichtungen durchgeführt. Die Erfindung betrachtet sowohl das Sterilisationsverfahren als auch das sterilisierte Produkt, das durch das Verfahren produziert wurde.

Kurze Beschreibung der Zeichnungen

[0023] Die vorhergehenden und weitere Aufgaben der Erfindung, die verschiedenen Merkmale hiervon ebenso wie die Erfindung selbst kann vollständig durch die nachfolgende Beschreibung verstanden werden, wenn sie zusammen mit der begleitenden Zeichnung gelesen werden, in der **Fig.** 1 eine graphische Darstellung ist, die die Fähigkeit von aus bestrahlten und nicht bestrahlten knochenbildenden Vorrichtungen extrahierten Proben zeigt, eine alkalische Phosphatase-Aktivität in einem Ratten-Osteoblastenzellassay zu stimulieren. Die Linie mit den ausgefüllten Dreiecken zeigt eine Probe, die aus einer Kontrollmatrix extrahiert wurde, die OP-1 nicht enthält; die Spur mit ausgefüllten Quadraten zeigt eine Probe von unbehandeltem OP-1; die Spur mit Kreuzen zeigt eine Probe, die aus einer ersten, nicht bestrahlten OP-1 enthaltenden Vorrichtung extrahiert wurde; die Spur mit Sternchen zeigt eine Probe, die aus der ersten bestrahlten OP-1 enthaltenen Vorrichtung extrahiert wurde; und die Spur mit den gedrehten Kreuzen zeigt eine Probe, die aus der zweiten bestrahlten OP-1 enthaltenden Vorrichtung extrahiert wurde.

Ausführliche Beschreibung der Erfindung

[0024] Es wurde nunmehr entdeckt, dass eine knochenbildende Vorrichtung, die durch Exposition gegenüber einer ionisierenden Strahlung in einer luftarmen Umgebung terminal sterilisiert würde und die ein knochenbildendes Protein in Kombination mit einem Trägermaterial umfasst, ihre biologische Aktivität nach Sterilisation beibehält und dazu in der Lage ist, eine Ersatzknochenbildung und/oder Knorpelbildung zu induzieren, wenn sie einem Säugetier implantiert wird. Diese Entdeckung ist unerwartet, weil eine ionisierende Strahlung die Proteinstruktur modifizieren kann und dadurch die biologische Aktivität zerstören kann.

[0025] Das hierin beschriebene allgemeine Verfahren stellt die Sterilität der osteogenetischen Vorrichtung sicher, während die biologische Aktivität des osteogenetischen Proteins, das in die Vorrichtung eingebaut ist, aufrechterhalten bleibt. Das Verfahren schließt die Schritte ein, ein unlösliches Trägermaterial und ein biologisch aktives knochenbildendes Protein zu kombinieren und dann die Kombination durch Exposition gegenüber ionisierender Strahlung in einer luftarmen Umgebung zu sterilisieren, wodurch eine sterile Vorrichtung erzeugt wird, die eine Knochenbildung nach einer Implantation in das Säugetier induziert. Das Verfahren kann für eine Vielzahl knochenbildender Proteine, Trägermatrizes und Formulierungen hiervon verwendet werden. Das Verfahren kann ebenfalls dazu verwendet werden, Vorrichtungen zu erzeugen, die zum Induzieren einer Gelenkknorpelbildung in einer avaskulären Stelle in vivo geeignet sind.

[0026] Die Herstellung von terminal sterilisierten knochenbildenden Vorrichtungen mit einer knochen- oder gelenkknorpelbildenden Aktivität in vivo, geeignete knochenbildende Proteine, die Natur und Eigenschaften des Trägermaterials, Behandlungen zur Minimierung einer Proteinmodifikation, Bedingungen, die eine terminale Sterilisation ermöglichen und andere Materialaspekte betreffend die Natur und Nützlichkeit der Erfindung einschließlich wie der hierin beanspruchte Gegenstand herzustellen und zu verwenden ist, wird aus dem Nachfolgenden besser verständlich werden.

I. Knochenbildende Proteine

[0027] Wie hierin definiert schließen die osteogenetischen Proteine, die in der Zusammensetzung und den Verfahren der Erfindung von Nutzen sind die Familie der dimeren Proteine, die eine Ersatzknochen-Aktivität aufweisen ein, wenn sie in ein Säugetier in Verbindung mit einer Matrix implantiert werden, und die eine Subklasse der „Superfamilie" von „TGF-β-artigen" Proteine umfassen. Osteogenetisches Protein aus natürlicher Quelle in seiner reifen, nativen Form ist ein glykosyliertes Dimer, das typischerweise ein apparentes Molekulargewicht von ungefähr 30-36 kDa aufweist, wie es durch SDS-PAGE bestimmt wird. Wenn es reduziert ist, lässt das 30 kDa Protein zwei glykosylierte Peptiduntexeinheiten mit apparenten Molekulargewichten bzw. relativen Molekülmassen von ungefähr 16 kDa und 18 kDa entstehen. In reduziertem Zustand weist das Protein keine nachweisbare osteogenetische Aktivität auf. Das unglykosylierte Proteindimer, das ebenfalls osteogenetische Aktivität aufweist, weist ein apparentes Molekulargewicht von ungefähr 27 kDa auf. Wenn es reduziert ist, lässt das 27 kDa Protein zwei unglykosylierte Polypeptide mit Molekulargewichten von ungefähr 14 kDa bis 16 kDa entstehen. Nützliche Sequenzen schließen solche ein, die die C-terminalen 102 Aminosäuresequenzen von DPP (von Drosophila), Vgl (von Xenopus), Vgr-1 (von der Maus), die OP-1 und OP-2 Proteine (siehe U.S.-Patent Nr. 5 011 691) ebenso wie die als BMP2, BMP3, BMP4 (siehe WO88/00205, U.S.-Patent-Nr. 5 013 649 und WO91/18098), BMP5 und BMP6 (siehe WO90/11366, PCT/US90/01630), BMP8 und BMP9 bezeichneten Proteine, umfassen.

[0028] Die Mitglieder dieser Familie von Proteinen teilen ein konserviertes Sechs- oder Sieben-Cystein-Skelett im C-terminalen Bereich. Siehe beispielsweise die Reste 335-431 von Seq. ID No. 1 in US 5 266 683, deren Offenbarung durch diese Bezugnahme hierin mit aufgenommen ist, die die hierin als „OPS" bezeichneten Sieben-Cystein-Skelettreste definieren oder die Reste 330-431 von Seq. ID No. 1 darin, die 102 Aminosäuren umfassen, die das Sieben-Cystein-Skelett definieren.

[0029] Diese Familie von Proteinen schließt längere Formen eines gegebenen Proteins, ebenso wie phylogenetische Formen, beispielsweise Spezies- und Allel-Varianten und biosynthetische Mutanten ein, einschließlich Additions- und Deletionsmutanten und Varianten wie beispielsweise solche, die das konservierte C-terminale Cysteinskelett verändern können, vorausgesetzt, dass die Veränderung es dem Protein nach wie vor ermöglicht, eine dimere Spezies mit einer Konfirmation zu bilden, die zur Induktion einer Knochenbildung in einem Säugetier in der Lage ist, wenn sie in das Säugetier in Verbindung mit einer Matrix implantiert wird. Zusätzlich können die osteogenetischen Proteine, die in den Vorrichtungen dieser Erfindung von Nutzen sind, Formen mit variierenden Glykosylierungsmustern und variierenden N-Termini einschließen. Die osteogenetischen Proteine können natürlich vorkommen oder biosynthetisch gewonnen werden und können durch Expression rekombinanter DNA in prokaryotischen oder eukaryotischen Zellen erzeugt werden. Die Proteine sind als einzelne Spezies aktiv, beispielsweise als ein Homodimer oder als gemischte Spezies kombiniert, beispielsweise als ein Heterodimer.

[0030] Bei einer Ausführungsform umfasst das hierin betrachtete osteogenetische Protein OP-1 oder eine OP-1 verwandte Sequenz. Nützliche OP-1 Sequenzen werden im US-Patent Nr. 5 011 691; 5 018 753 und 5 266 683 erwähnt; in Ozkynak et al. (1990) EMBO J. 9: 2.085-2.093; und Sampath et al. (1993) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90: 6.004-6.008, deren Offenbarungen durch diese Bezugnahme hierin mit aufgenommen sind. OP-1 verwandte Sequenzen schließen xenogene Homologe ein, beispielsweise; 60A von Drosophila, Wharton et al. (1991) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88: 9.214-9.218) und Proteine, die mehr als 60% Identität mit OP-1 in der C-terminalen Sieben-Cystein-Domäne, vorzugsweise zumindest 65% Identität, teilen. Beispiele von OP-1 verwandten Sequenzen schließen OP-2, BMP5, BMP6 und dessen Spezies-Homolog Vgr-1 (Lyons et al. (1989) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86: 4.554-4.558; Celeste, et al. (1990) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87: 9.843-9.847; und die internationale Patentanmeldung WO93/00432; Ozkaynak et al. (1992) J. Biol. Chem. 267: 13.198-13.205) ein. Wie vom Durchschnittsfachmann auf dem Gebiet leicht erkannt wird, können die chimären Konstrukte unter Verwendung von Standardmolekularbiologie und Mutagenesetechniken durch Kombinieren verschiedener Anteile unterschiedlicher morphogenetischer Proteinsequenzen zur Erzeugung einer neuen Sequenz erzeugt werden und diese Formen des Proteins werden hierin ebenfalls betrachtet.

[0031] Bei einem noch weiteren Grundgedanken wird eine oder beide der Polypeptidkettenuntereinheiten des osteogenetisch aktiven Dimers von einer Nukleinsäuresequenz kodiert, die unter stringenten Hybridisierungsbedingungen an DNA- oder RNA-Sequenzen hybridisiert, die zur Nukleinsäuresequenz, die die aktive Region von OP-1 kodiert, komplementär ist. Wie hierin verwendet sind stringente Hybridisierungsbedingungen als Hybridisierung in 40% Formamid, 5 X SSPE, 5 X Denhardt's Lösung und 0,1% SDS bei 37°C über Nacht und Waschen in 0,1 X SSPE, 0,1% SDS bei 50°C definiert.

[0032] Unter Vorgabe der vorhergehenden Aminosäure- und DNA-Sequenzinformation, dem Grad der Fähigkeit auf dem Fachgebiet und den Veröffentlichungen zahlreicher Publikationen bezüglich osteogenetischer Proteine, einschließlich U.S.-Patent 5 011 691 und der veröffentlichten PCT-Anmeldung US89/01469 (veröffentlicht am 19. Oktober 1989) können verschiedene DNAs konstruiert werden, die zumindest die aktive Domäne eines in den Vorrichtungen dieser Erfindung nützlichen osteogenetischen Proteins und verschiedene

Analoge hiervon kodieren (einschließlich Spezies- und Allelvarianten und solchen, die gentechnisch veränderte Mutationen enthalten), ebenso wie Fusionsproteine, trunkierte Formen der reifen Proteine, Deletions- und Additionsmutanten und ähnliche Konstrukte, die in den Vorrichtungen und Verfahren der Erfindung verwendet werden können. Darüber hinaus können DNA-Hybridisierungssonden aus Fragmenten jedes dieser Proteine gewonnen werden oder de novo aus der generischen Sequenz, die oben als OPS definiert wurde, entwickelt werden. Diese Sonden können dann zum Screenen unterschiedlicher genomischer und cDNA-Bibliotheken zur Identifizierung zusätzlicher osteogenetischer Proteine verwendet werden, die bei den Prothesevorrichtungen dieser Erfindung von Nutzen sind.

[0033] Die DNAs können vom Fachmann auf dem Gebiet unter Verwendung wohl bekannter DNA-Manipulationstechniken hergestellt werden, die genomische und cDNA-Isolation, Konstruktion synthetischer DNA aus synthetisierten Oligonukleotiden und Kassettenmutagenesetechniken einschließen. 15-100mer Oligonukleotide können auf einem DNA-Synthetisiergerät synthetisiert und durch Polyacrylamid-Gelelektrophorese (PAGE) in Tris-Borat-EDTA-Puffer gereinigt werden. Die DNA kann dann aus dem Gel elektroeluiert werden. Überlappende Oligomere können durch T4-Polynukleotidkinase phosphoryliert und in größeren Blocks ligiert werden, die ebenfalls durch PAGE gereinigt werden.

[0034] Die DNA von in geeigneter Weise identifizierten Klonen kann dann isoliert, subkloniert (vorzugsweise in einen Expressionsvektor) und sequenziert werden. Plasmide, die die interessierenden Sequenzen enthalten, können dann in eine geeignete Wirtszelle zur Proteinexpression und zur weiteren Charakterisierung transfiziert werden. Der Wirt kann eine prokaryotische oder eine eukaryotische Zelle sein, weil das Unvermögen der letzteren ein Protein zu glykosylieren die morphogenetische Aktivität des Proteins nicht zerstören wird. Nützliche Wirtszellen schließen E. coli, Saccharomyces, das Insekten/Baculoviruszellsystem, Myelomazellen, CHO-Zellen und verschiedene andere Säugetierzellen ein. Die Vektoren können zusätzlich verschiedene Sequenzen zur Förderung einer korrekten Expression des rekombinanten Proteins kodieren, einschließlich eines Transkriptionspromotors und von Terminationssequenzen, Enhancersequenzen, bevorzugten Ribosomen-Bindungsstellensequenzen, bevorzugten RNA-Leadersequenzen, bevorzugten Signalsequenzen zur Proteinsezernierung und dergleichen.

[0035] Die DNA-Sequenz, die das interessierende Gen kodiert, kann ebenfalls so manipuliert werden, dass potentiell hemmende Sequenzen entfernt oder unerwünschte Sekundärstrukturbildungen minimiert werden. Das rekombinante osteogenetische Protein kann ebenfalls als ein Fusionsprotein exprimiert werden. Nachdem es translatiert ist, kann das Protein aus den Zellen aufgereinigt oder aus dem Kulturmedium gewonnen werden. Alle biologisch aktiven Proteinformen umfassen dimere Spezies, die durch Disulfidbrücken oder in anderer Weise verbunden sind, hergestellt durch Falten und Oxidieren einer oder mehrerer der verschiedenen rekombinanten Polypeptidketten innerhalb einer geeigneten Eukaryontenzelle oder in vitro nach Expression von individuellen Untereinheiten. Eine ausführliche Beschreibung osteogenetischer Proteine, die aus rekombinanter DNA in E. coli und in zahlreichen unterschiedlichen Säugetierzellen exprimiert werden, ist im U.S.-Patent Nr. 5 266 683 offenbart.

[0036] Alternativ können die osteogenetischen Polypeptidketten chemisch unter Verwendung herkömmlicher Peptidsynthesetechniken synthetisiert werden, die dem Durchschnittsfachmann auf dem Gebiet wohl bekannt sind. Beispielsweise können die Proteine intakt oder in Teilen auf einem Festphasenpeptid-Synthetisiergerät unter Verwendung von Standardbetriebsverfahren synthetisiert werden. Vollständige Ketten werden dann deprotektiert und durch HPLC (high pressure liquid chromatography = Hochdruckflüssigkeitschromatographie) aufgereinigt. Wenn das Protein in Teilen synthetisiert wird, können die Teile unter Verwendung von Standardmethodologien zur Bildung des intakten Proteins peptidgebunden werden. Im Allgemeinen ist die Weise, in der die osteogenetischen Proteine hergestellt werden konventionell, und bildet keinen Teil dieser Erfindung.

II. Trägermatrixmaterial

A. Allgemeine Matrixerwägungen

[0037] Wie der Fachmann auf dem Gebiet erkennen wird ist, vorausgesetzt, dass die Matrix eine dreidimensionale Struktur aufweist, die ausreichend ist, um als ein Gerüst für infiltrierende und proliferierende Zellen zu dienen und in vivo biokompatibel und bioresorbierbar ist, die genaue Natur des Substrates, das per se für die hierin verwendeten Matrices verwendet wird, letztendlich für die Bestimmung der Fähigkeit der Vorrichtungen, neuen Knochen oder eine Gelenkknorpelgewebsbildung zu induzieren, nicht entscheidend. In der vorliegenden Erfindung dient das Substrat als ein Gerüst, auf dem bestimmte zelluläre Ereignisse, vermittelt durch ein osteogenetisches Protein, auftreten können. Die speziellen Reaktionen des osteogenetischen Proteins werden durch die endogene Mikroumgebung an der Implantationsstelle und durch das Entwicklungspotential der reagierenden Zellen diktiert. Der Fachmann wird ebenfalls anerkennen, dass die genaue Auswahl des für die Matrizes, die hierin offenbart sind, verwendeten Substrates teilweise vom zu reparierenden Defekttyp, von anatomischen Erwägungen, wie beispielsweise dem Ausmaß der Vaskularisation an der Defektstelle und derglei-

chen abhängen wird.

[0038] Die Matrixgeometrie, die Teilchengröße, die Anwesenheit einer Oberflächenladung und der Porositätsgrad (Zellinfiltrierende Zwischenräume) sind alle für eine erfolgreiche Matrixleistung von Bedeutung. Es ist bevorzugt, die Matrix in der erwünschten Form des neuen Knochens oder Gelenkknorpelgewebes, die gebildet werden sollen, auszuformen. Rattenstudien zeigen, dass der neue Knochen im Wesentlichen mit den Dimensionen der implantierten Vorrichtung gebildet wird.

[0039] Die Matrix kann einen formerhaltenden Feststoff umfassen, der aus locker anhaftendem, teilchenförmigem Material hergestellt ist, beispielsweise mit Kollagen. Sie kann ebenfalls einen gegossenen, porösen Feststoff oder einfach eine Aggregation von eng gepackten Teilchen umfassen, die durch ein umgebendes Gewebe am Ort gehalten werden. Die Matrix kann weiterhin einen unlöslichen, nicht teilchenförmigen Feststoff mit Zwischenräumen umfassen die ausreichend sind, um die Anlagerung und Proliferation infiltrierender Zellen zu erlauben. Abgebauter Muskel oder devitalisiertes, biologisch inertes Gewebe kann verwendet werden, insbesondere wenn sie wie hierin beschrieben hergestellt wird. Große allogene Knochenimplantate können ebenfalls für die Matrix dienen, wenn deren Markhöhlen gereinigt und mit Träger und dem dispergierten osteogenetischen Protein bepackt werden. Alternativ können die Knochenimplantate als Träger per se dienen und in solchen Fällen kann das osteogenetische Protein direkt auf die Oberfläche des Knochenimplantats aufgeschichtet werden.

[0040] Wo die osteogenetische Vorrichtung zur Bildung neuen Knochens in einem Säugetier formuliert wird, umfasst das gegenwärtig bevorzugte Matrixmaterial devitalisiertes, demineralisiertes xenogenes Knochengewebe, das wie hierin offenbart behandelt ist. Die formulierten Vorrichtungen erzeugen ein implantierbares Material, das in einer Vielzahl von klinischen Situationen nützlich ist. Zusätzlich zu dessen Verwendung als Matrix zur Knochenbildung in verschiedenen orthopädischen, periodontalen und rekonstruktiven Verfahren kann die Matrix ebenfalls als Träger mit verzögerter Freisetzung oder als kollagenförmige Beschichtung für Implantate verwendet werden. Die Matrix kann wie erwünscht in Vorwegnahme des chirurgischen Eingriffs geformt werden oder kann durch den Arzt oder Techniker während des chirurgischen Eingriffs geformt werden. Somit kann das Material für topische, subkutane, intraperitoneale oder intramuskuläre Implantate verwendet werden; es kann so geformt werden, so dass es eine nicht gleichförmige bzw. schlecht heilende Fraktur überspannt oder um einen Knochendefekt auszufüllen.

B. Matrizes aus natürlicher Quelle

[0041] Geeignete allogene oder xenogene Matrizes können wie hierin nachstehend beschrieben unter Verwendung von Verfahren erzeugt werden, die in der Technik wohl bekannt sind. Speziell sind die Verfahren so entwickelt, dass die zellulären nicht strukturellen Bestandteile des Gewebes extrahiert werden, um das Gewebe zu devitalisieren. Das sich ergebende Material umfasst eine zelluläre Matrix, die Zwischenräume definiert, die durch Zellen infiltriert werden können und die im Wesentlichen von nicht strukturell gebundenen Bestandteilen depletiert bzw. abgereichert sind.

[0042] Ein gegenwärtig bevorzugtes Verfahren zur Devitalisierung von nicht mineralisiertem Gewebe folgt einer Methodologie wie beispielsweise derjenigen, die in der Technik zum Fixieren von Gewebe verwendet wird. Das Gewebe wird einem nicht polaren bzw. unpolaren Lösungsmittel, wie beispielsweise 95% Ethanol für eine Zeitspanne gegenüber ausgesetzt, die ausreicht, um den Wassergehalt des Gewebes im Wesentlichen durch Ethanol zu ersetzen und die Zellstruktur des Gewebes zu zerstören. Typischerweise wird das Gewebe 200 Proof Ethanol für mehrere Tage bei einer Temperatur im Bereich von ungefähr 4°C-40°C ausgesetzt, und es wird Sorge getragen, die Lösung alle 6 bis 12 Stunden durch frischen Ethanol zu ersetzen bis zu dem Zeitpunkt, zu dem der Flüssigkeitsgehalt des Gewebes 70-90% Ethanol umfasst. Typischerweise ist eine Behandlung für 3-4 Tage geeignet. Das Volumen der Flüssigkeit, die zugesetzt wird, sollte ausreichend genug sein, um das Gewebe unterzutauchen. Das behandelte Gewebe wird dann lyophilisiert bzw. gefriergetrocknet. Die sich ergebende trockne bzw. wasserfreie Matrix wird im Wesentlichen von nicht strukturellen Bestandteilen abgereichert, erhält jedoch sowohl intrazelluläre als auch extrazelluläre Matrixbestandteile, die von dem Gewebe abstammen, bei.

[0043] Behandelte allogene oder xenogene Matrizes haben zur Erzeugung von Vorrichtungen zur Ausbildung von neuen Knochen oder Gelenkknorpeln in einem Säugetier besondere Nützlichkeit. Eine osteogenetische Vorrichtung kann aus einem allogenen Knochen zur Steigerung einer Allotransplantat-Reparatur formuliert werden. Devitalisiertes allogenes oder xenogenes Trägermaterial kann ebenfalls mit osteogenetischem Protein kombiniert werden, um eine feste, resorbierbare Matrix bereitzustellen, die einen strukturellen Träger für große Knochendefekte bereitstellt. In ähnlicher Weise kann eine allogene Gelenkknorpelvorrichtung aus devitalisiertem Knorpelgewebe oder einem anderen inerten, nicht mineralisierten Matrixmaterial und osteogenetischem Protein gebildet werden und die Vorrichtung kann auf die subchondrale Knochenoberfläche als eine Schicht aufgelegt werden. Alternativ kann eine formulierte Vorrichtung pulverisiert oder in anderer Weise mechanisch abgerieben werden, um Teilchen zu erzeugen, die zu einer Paste oder Gel zur Aufbringung auf die

Knochenoberfläche wie hierin beschrieben formuliert werden.

C. Knochenabgeleitete Matrizes

[0044] Das nachfolgende stellt gegenwärtig bevorzugte Methodologien zur Erzeugung geeigneter Matrizes aus mineralisiertem Gewebe, insbesondere allogenem oder xenogenem Knochengewebe, bereit.

C.1 Demineralisierte Knochenmatrix

[0045] Demineralisierte Knochenmatrix, vorzugsweise Rinderknochenmatrix, wird durch früher veröffentlichte Verfahren (Sampath et al. (1983) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 80: 6.591-6.595) hergestellt. Rinderschlüsselbeinknochen werden aus einem ortsansässigen Schlachthaus bezogen und frisch verwendet. Von den Knochen werden Muskel und Fett abgezogen. Die Knochenhaut wird gereinigt, die Knochen werden durch Druck mit kaltem Wasser entmarkt, in kaltem absolutem Ethanol eingetaucht und bei –20°C aufbewahrt. Sie werden darauf getrocknet und durch Zerstoßen fragmentiert und in einer großen Mühle pulverisiert. Es wird Vorsicht getragen, eine Erhitzung zu vermeiden, indem flüssiger Stickstoff verwendet wird. Der pulverisierte Knochen wird zu einer Partikelgröße im Bereich von 70-850 µm, vorzugsweise 150-420 µm vermahlen und wird durch zwei Waschungen von ungefähr zweistündiger Dauer und drei Volumina Chloroform : Methanol (3 : 1) entfettet. Der teilchenförmige Knochen wird dann mit einem Volumen absolutem Ethanol gewaschen und über einem Volumen wasserfreiem Äther getrocknet, wodurch entfettetes Knochenpulver erzielt wird.
[0046] Das entfettete Knochenpulver wird dann durch aufeinander folgende Behandlungen mit 10 Volumina 0,5N HCl bei 4°C für 40 Minuten demineralisiert. Zuletzt wird das demineralisierte Knochenpulver durch Waschen mit einem großen Volumen Wasser neutralisiert.

C.2 Guanidinextraktion

[0047] Demineralisierte Knochenmatrix, die so hergestellt wird, wird mit 5 Volumina 4M Guanidin-HCl, 50 mM Tris-HCl, pH 7,0 für 16 Stunden bei 4°C extrahiert. Die Suspension wird filtriert. Das unlösliche Material wird gesammelt und zur Herstellung der Matrix verwendet. Das sich ergebende Material ist überwiegend von kollagenöser Natur und es fehlt ihm eine osteogenetische oder chondrogenetische Aktivität.

C.3 Matrixbehandlungen

[0048] Der Hauptbestandteil aller Knochenmatrizes ist Typ I Kollagen. Zusätzlich zu Kollagen schließt demineralisierter Knochen, der wie oben offenbart extrahiert wurde, nicht kollagenöse Proteine ein, die 5% von dessen Masse ausmachen können. In einer xenogenen Matrix können diese nicht kollagenösen Bestandteile selbst als potente bzw. wirkungsvolle Antigene vorliegen und können immunogene und/oder inhibitorische Bestandteile darstellen. Diese Bestandteile können ebenfalls eine Osteogenese in allogenen Implantaten durch Stören der Entwicklungskaskade der Knochendifferenziation hemmen. Es wurde entdeckt, dass eine Behandlung der Matrixteilchen mit einem Kollagenfibrillen-modifizierenden Mittel potentiell unerwünschte Bestandteile aus der Matrix extrahiert und die Oberflächenstruktur des Matrixmaterials verändert. Nützliche Mittel schließen Säuren, organische Lösungsmittel oder erhitzte wässrige Medien ein. Verschiedene Behandlungen sind nachstehend beschrieben. Eine ausführliche physikalische Analyse der Wirkung, die diese Fibrillen modifizierenden Mittel auf demineralisierte, Guanidin-extrahierte Knochenkollagenteilchen aufweisen, ist in der gleichzeitig anhängigen U.S.-Patentanmeldung Seriennr. 483 913, eingereicht am 22. Februar 1990 offenbart.
[0049] Nach Kontakt mit dem Fibrillen-modifizierenden Mittel wird die behandelte Matrix gewaschen, um alle extrahierten Bestandteile zu entfernen. Kurz gesagt wird die Matrix in TBS (Tris-gepufferter Salzlösung) 1 g/200 ml suspendiert und bei 4°C für 2 Stunden gerührt; oder in 6M Urea, 50 mM Tris-HCl, 500 mM NaCl, pH 7,0 (UTBS) gerührt bei Raumtemperatur (RT) für 30 Minuten (ausreichende Zeit, um den pH zu neutralisieren). Das Material wird durch Zentrifugation geerntet, erneut unter den vorher erwähnten Bedingungen gewaschen und durch Zentrifugation erneut geerntet. Das sich ergebende Material wird mit Wasser gewaschen und dann lyophilisiert.

C.3.1 Säurebehandlungen

C.3.la Trifluoressigsäure

[0050] Trifluoressigsäure (Trifluoroacetic acid = TFA) ist eine starke nicht oxidierende Säure, die als Quellmittel für Proteine bekannt ist und die Kollagenfibrillen modifiziert. Rinderknochenreste, die wie oben beschrieben hergestellt wurden werden gesiebt und Teilchen der geeigneten Größe werden gesammelt. Diese Teilchen

werden mit verschiedenen Prozentsätzen (1,0% bis 100%) Trifluoressigsäure und Wasser (V/V) bei 0°C oder Raumtemperatur für 1-2 Stunden unter konstantem Rühren extrahiert. Die behandelte Matrix wird filtriert, lyophilisiert oder mit Wasser/Salz gewaschen und dann lyophilisiert.

C.3.1b Flusssäure

[0051] Wie Trifluoressigsäure ist Flusssäure (HF) eine starke Säure und ein Quellmittel und ist ebenfalls dazu in der Lage, die intrapartikuläre Oberflächenstruktur zu verändern. Flusssäure ist ebenfalls ein bekanntes Entglykosylierungsmittel. Als solches kann Flusssäure zur Erhöhung der osteogenetischen Aktivität dieser Matrizes durch Entfernen des antigenen Kohlenhydrat gehaltes vieler Glykoproteine dienen, die noch mit der Matrix nach Guanidinextraktion verbunden sind.

[0052] Rinderknochenrest wurde wie oben beschrieben hergestellt und gesiebt und die Teilchen geeigneter Größe werden gesammelt. Die Probe wird im Vakuum über P_2O_5 getrocknet, in ein Reaktionsgefäß übertragen und gegenüber wasserfreier Flusssäure (10–20 ml/g Matrix) durch Destillation auf die Probe bei –70°C exponiert. Man lässt das Gefäß auf 0 °C erwärmen und dann wird das Reaktionsgemisch bei dieser Temperatur 120 Minuten lang gerührt. Nach Abdampfen der Flusssäure im Vakuum wird der Rückstand sorgfältig über KOH-Pellets in Vacuo getrocknet, um jede verbleibende Spur von Säure zu entfernen. Das Ausmaß der Entglykosylierung kann aus einer Kohlenhydratanalyse von Matrixproben bestimmt werden, die vor und nach der Behandlung mit Flusssäure entnommen werden, nachdem die Proben in geeigneter Weise gewaschen wurden, um nicht kovalent gebundene Kohlenhydrate zu entfernen. SDS-extrahiertes Protein aus HF-behandeltem Material ist wie durch Con A blotting bestimmt bezüglich Kohlenhydraten negativ. Darauf wird die entglykosylierte Knochenmatrix zweimal in TBS (Tris buffered sahne = Tris-gepufferte Salzlösung) oder UTBS gewaschen, dann mit Wasser gewaschen und darauf lyophilisiert. Andere Säurebehandlungen werden jedoch zusätzlich zu HF und TFA anvisiert.

C.3.2 Lösungsmittelbehandlung

C.3.2a. Dichlormethan

[0053] Dichlormethan (DCM) ist ein organisches Lösungsmittel, das zum Denaturieren von Proteinen ohne Beeinträchtigung ihrer Primärstruktur in der Lage ist. Dieses Quellmittel ist ein übliches Mittel in der automatisierten Peptidsynthese und wird in Waschschritten zur Entfernung der Bestandteile verwendet. Rinderknochenrest, hergestellt wie oben beschrieben, wird gesiebt und die Teilchen der geeigneten Größe werden in 100% DCM oder vorzugsweise 99,9% DCM/0,1% TFA inkubiert. Die Matrix wird mit dem Quellmittel für eine oder zwei Stunden bei 0°C oder bei Raumtemperatur inkubiert. Alternativ wird die Matrix mit dem Mittel zumindest drei Mal mit kürzeren Waschungen (20 Minuten jeweils) ohne Inkubation behandelt.

C.3.2b. Acetonitril

[0054] Acetonitril (ACN) ist ein organisches Lösungsmittel, das zum Denaturieren von Proteinen ohne Beeinträchtigung ihrer Primärstruktur in der Lage ist. Es ist ein übliches Reagens, das in der Hochleistungsflüssigchromatographie verwendet wird und wird zum Eluieren von Proteinen aus Siliziumdioxid-basierten Säulen durch Stören hydrophober Wechselwirkungen verwendet. Rinderknochenrestteilchen der geeigneten Größe, hergestellt wie oben beschrieben, werden mit 100% ACN (1,0 g/30 ml) oder vorzugsweise 99,9% ACN/0,1% TFA bei Raumtemperatur 1-2 Stunden unter konstantem Rühren behandelt. Die behandelte Matrix wird dann mit Wasser, einem Urea-Puffer oder 4M NaCl gewaschen und darauf lyophilisiert. Alternativ kann die ACN oder ACN/TFA-behandelte Matrix ohne Waschen lyophilisiert werden.

C.3.2c. Isopropanol

[0055] Isopropanol ist ebenfalls ein organisches Lösungsmittel, das zum Denaturieren von Proteinen in der Lage ist, ohne deren Primärstruktur zu beeinträchtigen. Es ist ein übliches Reagenz, das zum Eluieren von Proteinen aus Silica bzw. Siliziumdioxid HPLC-Säulen verwendet wird. Rinderknochenrestteilchen der geeigneten Größe, die wie oben beschrieben hergestellt werden, werden mit 100% Isopropanol (1,0 g/30 ml) oder vorzugsweise in Gegenwart von 0,1 TFA bei Raumtemperatur für 1-2 Stunden unter konstantem Rühren behandelt. Die Matrix wird dann mit Wasser, Urea-Puffer oder 4 M NaCl gewaschen, bevor sie lyophilisiert wird.

C.3.2d. Chloroform

[0056] Chloroform kann ebenfalls zur Erhöhung der Oberflächenfläche von Knochenmatrix wie die oben dar-

gelegten Reagenzien verwendet werden, entweder alleine oder angesäuert. Die Behandlung wie oben dargelegt ist dazu wirksam, sicherzustellen, dass das Material vor der Implantation frei von Pathogenen ist.

C.3.3 Hitzebehandlung

[0057] Das gegenwärtig am meisten bevorzugte Mittel ist erhitztes wässriges Fibrillenmodifizierendes Medium wie beispielsweise Wasser, um die Oberfläche der Matrixteilchen fläche und deren Porosität zu erhöhen. Das gegenwärtig am meisten bevorzugte wässrige Medium ist ein saures wässriges Medium mit einem pH von weniger als ungefähr 4,5, beispielsweise im Bereich von ungefähr pH 2 bis pH 4, der dabei helfen kann, das Kollagen vor dem Erhitzen „aufzuquellen". 0,1% Essigsäure, die einen pH von 3 hat, wird gegenwärtig am meisten bevorzugt. 0,1 M Essigsäure kann ebenfalls verwendet werden.
[0058] Verschiedene Mengen an entfettetem demineralisiertem Guanidin-extrahierten Knochenkollagen werden im wässrigen Medium (1 g Matrix/30 ml wässriges Medium) unter konstantem Rühren in einem Wassermantelglaskolben erhitzt und bei einer vorgegebenen Temperatur für eine vorherbestimmte Zeitspanne gehalten. Bevorzugte Behandlungszeiten sind ungefähr eine Stunde, obwohl die Expositionszeiten von zwischen ungefähr 0,5 bis zwei Stunden akzeptabel erscheinen. Die verwendete Temperatur wird bei einer Temperatur im Bereich von ungefähr 37°C bis 65°C konstant gehalten. Die gegenwärtig bevorzugte Hitzebehandlungstemperatur liegt innerhalb des Bereichs von ungefähr 45°C bis 65°C.
[0059] Nach der Hitzebehandlung wird die Matrix filtriert, gewaschen, lyophilisiert und zum Implantieren verwendet. Wenn ein saures wässriges Medium verwendet wird, wird die Matrix ebenfalls vor dem Waschen und der Lyophilisation neutralisiert. Ein gegenwärtig bevorzugter Neutralisierungspuffer ist ein 200 mM Natriumphosphatpuffer, pH 7,0. Um die Matrix zu neutralisieren wird die Matrix vorzugsweise zuerst abkühlen gelassen, das saure wässrige Medium (beispielsweise 0,1% Essigsäure) wird dann entfernt und durch den Neutralisierungspuffer entfernt und die Matrix für ungefähr 30 Minuten geschüttelt. Der Neutralisierungspuffer kann dann entfernt und die Matrix gewaschen und lyophilisiert werden.
[0060] Die Matrix kann ebenfalls behandelt werden, so dass kontaminierende Schwermetalle entfernt werden, wie beispielsweise durch Exponieren der Matrix gegenüber einem Metallionenchelator bzw. Komplexbildner. Beispielsweise kann die Matrix im Anschluss an eine Wärmebehandlung mit 0,1% Essigsäure in einem Neutralisierungspuffer, der Natriumethylendiamintetraessigsäure (EDTA) enthält, beispielsweise 200 mM Natriumphosphat, 5 mM EDTA, pH 7,0 neutralisiert werden. 5 mM EDTA stellt einen ungefähr 100-fachen molaren Überschuss an Komplexbildner gegenüber übrigen Schwermetallen bereit, die in den meisten der bis jetzt getesteten kontaminierten Matrizes vorlagen. Eine anschließende Waschung der Matrix im Anschluss an eine Neutralisierung scheint den Großteil des EDTA zu entfernen. Eine EDTA-Behandlung der Matrixteilchen reduziert die restlichen Schwermetallgehalte aller Metalle die getestet wurden (Sb, As, Be, Cd, Cr, Cu, Co, Pb, Hg, Ni, Se, Ag, Zn, Ti) auf weniger als ungefähr 1 ppm. Bioassays mit den EDTA-behandelten Matrizes zeigen an, dass eine Behandlung mit den Metallionenkomplexbildnern die knocheninduzierende Aktivität nicht hemmt.
[0061] Die Kollagenmatrixmaterialien nehmen vorzugsweise die Form eines feinen Pulvers, das unlöslich in Wasser ist, ein, das nicht adhärente, bzw. zusammenhängende Teilchen umfasst. Es kann einfach durch Packen in das Volumen verwendet werden, indem ein neues Knochenwachstum oder eine verzögerte Freisetzung erwünscht ist, am Ort durch umgebendes Gewebe gehalten. Alternativ kann das Pulver eingekapselt werden, beispielsweise in eine Gelatineoder Polymilchsäurebeschichtung, die vom Körper leicht absorbiert wird. Das Pulver kann zu einem Volumen vorgegebener Dimensionen ausgeformt und in dieser Form durch Anhaften der Teilchen unter Verwendung von beispielsweise löslichen Spezies biokompatiblen Kollagens gehalten werden. Das Material kann ebenfalls in Blatt-, Stab-,Perlen- oder anderen makroskopischen Formen hergestellt werden.

D. Synthetische Matrizes

[0062] Als eine Alternative aus einer Matrix aus natürlicher Quelle oder als Ergänzung, die in Kombination mit einer Matrix aus natürlicher Quelle verwendet werden kann, kann eine geeignete Matrix ebenfalls de novo formuliert werden, unter Verwendung einer oder mehrerer Materialien, die zur Erzeugung einer dreidimensionalen Gerüststruktur dienen, die zur Einnahme der Dimensionen des erwünschten Ersatzgewebes geformt oder gegossen werden können. Vorzugsweise umfasst die Matrix ebenfalls Reste, die aus demselben Gewebstyp wie das zu induzierende Gewebe gewonnen sind und/oder Charakteristiken hiervon haben oder spezifisch hierfür sind. In gewissen Umständen wie bei der Bildung von Gelenkknorpel auf einer subchondralen Knochenoberfläche, kann osteogenetisches Protein in Kombination mit einer Matrix, die eine dreidimensionale Gerüststruktur definiert, die ausreicht, um die Anlagerung von infiltrierenden Zellen zu ermöglichen und die aus nicht mineralisiertem Material besteht, ausreichend sein. Irgendeines oder eine Kombination von Materialien kann in vorteilhafter Weise verwendet werden, einschließlich, ohne Beschränkung, Kollagen; Homopolymere oder Co polymere der Glykolsäure, Milchsäure und Buttersäure, einschließlich Derivaten hiervon; und Kerami-

ken, wie beispielsweise Hydroxyapatit, Kalziumphosphat und andere Kalziumphosphate und Kombinationen hiervon.

[0063] Der gewebsspezifische Bestandteil einer Synthesematrix kann in einfacher Weise durch Entvitalisieren bzw. Devitalisieren eines allogenen oder xenogenen Gewebes wie oben beschrieben gewonnen und dann pulverisiert oder in anderer Weise mechanisch zerbrochen werden, so dass die unlösliche Matrix zurückbleibt. Dieses teilchenförmige Material kann dann mit einer oder mehreren strukturellen Materialien kombiniert werden, einschließlich solchen, die hierin beschrieben sind. Alternativ können die gewebsspezifischen Bestandteile weiter aus der behandelten Matrix aus der Verwendung von Standardextraktionsverfahren aufgereinigt werden, die in der Technik wohl charakterisiert sind und unter Verwendung von Standardanalyseverfahren kann das extrahierte Material in jedem Reinigungsschritt bezüglich seiner Gewebsspezifität-Fähigkeit getestet werden. Für beispielhafte Gewebsextraktionsvorschriften siehe beispielsweise Sampath et al. (1987) Proc. Natl. Acad. Sci 78: 7.599-7.603 und US 4 968 590, deren Offenbarungen hierin durch Bezugnahme mit aufgenommen sind.

[0064] Eine synthetische Matrix kann erwünscht sein, wo beispielsweise ein Ersatz von Gelenkknorpel in einem existierenden Gelenk erwünscht ist, um beispielsweise einen Abriss- oder beschränkten oberflächlichen Defekt im Gewebe zu korrigieren oder die Höhe der Gelenkknorpeloberfläche, die aufgrund von Alter, Krankheit oder Trauma verschleißt, zu erhöhen. Solches „Wiederbeflächen" der Gelenkknorpelschicht kann unter Verwendung der Verfahren und Zusammensetzungen der vorliegenden Erfindung durch, in einer Ausführungsform, Behandeln eines Blattes aus einem allogenen oder xenogenen Gelenkknorpelgewebe wie hierin beschrieben, Beschichten der sich ergebenden Matrix mit osteogenetischem Protein, Aufrollen der formulierten Matrix, so dass sie in das Gelenk unter Verwendung orthoskopischer standardchirurgischer Techniken eingebracht werden kann und wenn sie einmal an der Stelle bereitgestellt ist, durch Entrollen der Vorrichtung als Schicht auf der Gelenkknochenoberfläche, erreicht werden.

[0065] In einer anderen Ausführungsform wird die Vorrichtung als Paste oder injizierbare gelartige Substanz formuliert, die auf der Gelenkknochenoberfläche in einem Gelenk unter Verwendung von orthoskopischen Standardchirurgietechniken injiziert werden kann. In dieser Ausführungsform kann die Formulierung eine pulverisierte oder in anderer Weise mechanisch abgebaute Vorrichtung umfassen, die sowohl Matrix als auch osteogenetisches Protein umfasst und zusätzlich ein oder mehrere Bestandteile, die an die Teilchen in einer pastenartigen oder gelartigen Substanz binden. Bindungsmaterialien, die in der Technik wohl charakterisiert sind schließen beispielsweise Carboxymethylcellulose, Glycerol, Polyethylenglykol und dergleichen ein. Alternativ kann die Vorrichtung osteogenetisches Protein, dispergiert in einer synthetischen Matrix umfassen, die die erwünschte physikalische Eigenschaft bereitstellt.

[0066] Als Beispiel ist eine synthetische Matrix mit einer Gewebsspezifität für Knorpel und Knochen in der WO91/18558 (veröffentlicht am 21. Dezember 1991) beschrieben. Kurz gesagt umfasst die Matrix ein poröses vernetztes Strukturpolymer aus biokompatiblen, biodegradierbarem Kollagen und geeigneten gewebsspezifischen Glycosaminoglycanen als gewebsspezifische Zellanhaftungsfaktoren. Kollagen, das aus mehreren Quellen abstammt, kann verwendet werden, einschließlich unlösliches Kollagen, säurelösliches Kollagen, Kollagen, das in neutralen oder basischen wässrigen Lösungen löslich ist, ebenso wie solche Kollagene, die kommerziell erhältlich sind.

[0067] Glycosaminoglycane (GAGS) oder Mucopolysaccharide sind Hexosamin-enthaltende Polysaccharide tierischen Ursprungs, die eine gewebsspezifische Verteilung aufweisen und deswegen zur Unterstützung der Bestimmung der Gewebsspezifität der morphogenstimulierten differenzierenden Zellen verwendet werden können. Eine Reaktion mit den GAGS stellt ebenfalls ein Kollagen mit weiteren wertvollen Eigenschaften bereit, das heißt das Unvermögen, eine Immunreaktion (Fremdkörperreaktion) aus einem Tierwirt hervorzurufen.

[0068] Chemisch werden GAGS aus Resten von Hexaminen gewonnen, die glykosidisch gebunden sind und in einer mehr oder weniger geordneten Weise mit entweder Hexouronsäure oder Hexosekomponenten alternieren (siehe beispielsweise Dodgson et al. In „Carbohydrate Metabolism and its Disorders", Dickens et al., Herausgeber, Band 1, Academic Press (1968)). Brauchbare GAGS schließen Hyaluronsäure, Heparin, Heparinsulfat, Chondoitin 6-Sulfat, Chondroitin 4-Sulfat, Dermatansulfat und Keratinsulfat ein. Andere GAGs können ebenfalls zur Bildung der hierin beschriebenen Matrix verwendet werden und der Fachmann auf dem Gebiet wird geeignete GAGS entweder kennen oder dazu in der Lage sein sie zu ermitteln, ohne mehr als Routineexperimente zu verwenden. Für eine ausführlichere Beschreibung von Mucopolysacchariden, siehe Aspinall, „Polysaccharides", Pergamon Press, Oxford (1970).

[0069] Kollagen kann mit einem GAG in wässrigen sauren Lösungen umgesetzt werden, vorzugsweise in verdünnten Essigsäurelösungen. Durch Zusatz von GAG tropfenweise in die wässrige Kollagendispersion ergeben sich Copräzipitate von verwickelten Kollagenfibrillen, die mit GAG beschichtet sind. Diese verwickelte Masse von Fasern kann dann zur Bildung einer homogenen Dispersion feiner Fasern homogenisiert und dann filtriert und getrocknet werden.

[0070] Eine Unlöslichkeit der Kollagen-GAG-Produkte kann bis zu einem erwünschten Grad durch kovalentes Verbinden dieser Materialien erzeugt werden, die ebenfalls dazu dienen, die Beständigkeit gegenüber einer

Resorption dieser Materialien zu erhöhen. Im Allgemeinen ist jedes vernetzende Verfahren zur Vernetzung von Kollagen ebenfalls zur Vernetzung dieser zusammengesetzten Materialien geeignet, obwohl ein Vernetzen durch ein dehydrothermisches Verfahren bevorzugt wird.

[0071] Wenn sie trocken sind, weisen die vernetzten Teilchen eine im Wesentlichen kugelförmige Form mit Durchmessern von ungefähr 500 μm auf. Eine Rasterelektronenmikroskopie zeigt Poren von ungefähr 20 μm auf der Oberfläche und 40 μm auf der Innenfläche. Das Innere ist sowohl aus faserartigen als auch blattartigen Strukturen aufgebaut, und ergibt damit Oberflächen zur Zellanlagerung. Die Leerräume verbinden sich, wodurch ein Zugang zu den Zellen durch das Innere des Teilchens bereitgestellt wird. Das Material scheint grob 99,5% Leervolumen aufzuweisen, was das Material bezüglich der potentiellen Zellmasse, die pro Gramm Mikroträger gezüchtet werden kann, sehr effizient macht.

[0072] Eine andere nützliche synthetische Matrix ist eine, die aus biokompatiblem, in vivo biodegradierbarem synthetischem Polymer formuliert wird, wie beispielsweise solche, die aus Glykolsäure, Milchsäure und/oder Buttersäure hergestellt werden, einschließlich Copolymeren und Derivaten hiervon. Diese Polymere sind in der Technik wohl beschrieben und sind kommerziell erhältlich. Beispielsweise sind 50 : 50 Gemische von poly D, L Lactid: Glycolid kommerziell von Boehringer Ingelheim erhältlich (beispielsweise RG503, RG506, RG502H und RG503H) und von Birmingham Polymers (beispielsweise Lactel). Zusätzlich können Polymere, die 80% Polylactid/20% Glycosid oder poly 3-Hydroxybuttersäure enthalten, von PolySciences Inc. bezogen werden. Die Polymerzusammensetzungen werden im Allgemeinen in teilchenförmiger Form bezogen und die osteogenetischen Vorrichtungen werden vorzugsweise unter wässrigen Bedingungen in Kombination mit einem organischen Lösungsmittel hergestellt (beispielsweise in einer Ethanol-Trifluoressigsäurelösung, EtOH/TFA). Zusätzlich kann man die Morphologie der teilchenförmigen Polymerzusammensetzungen verändern, um beispielsweise die Porosität zu erhöhen, unter Verwendung mehrerer spezieller Lösungsmittelbehandlungen, die in der Technik bekannt sind.

III. Herstellung der osteogenetischen Vorrichtung

[0073] Proteine aus natürlicher Quelle oder die rekombinanten Proteine, wie oben dargelegt, ebenso wie andere Konstrukte, können kombiniert und in einer geeigneten Matrixzubereitung unter Verwendung irgendeines der hierin und/oder in der US 5 266 683 offenbarten Verfahren kombiniert und dispergiert werden, deren Offenbarung durch Bezugnahme hierin mit aufgenommen ist.

[0074] Typischerweise wird das osteogenetische Protein in einem geeigneten Lösungsmittel gelöst und mit der Matrix vereinigt. Die Bestandteile lässt man sich verbinden. Typischerweise wird das kombinierte Material dann lyophilisiert mit dem Ergebnis, dass das osteogenetische Protein an die Oberflächen der Matrix abgelagert oder an die Oberflächen adsorbiert wird. Nützliche Solubilisierungslösungsmittel schließen ohne Einschränkung eine Ethanol/Trifluoressigsäurelösung (beispielsweise 47,5% EtOH/0,01% TFA); eine Acetonitril/TFA-Lösung; Ethanol; Ethanol in Wasser; oder wässrige Puffer ein. Zubereitungen in einem sauren Puffer können die Adsorption von OP-1 auf die Matrixoberfläche erleichtern. Für die Vorrichtung der Erfindung ist eine nützliche Zubereitungsvorschrift eine Inkubation der Matrix und des osteogenetischen Proteins in einer Ethanol/TFA-Lösung (beispielsweise 30-50% EtOH/0,01-0,1% TFA) für 24 Stunden, gefolgt von Lyophilisation. Dieses Verfahren ist ausreichend, um 70-90% des Proteins an die Matrixoberfläche zu adsorbieren oder zu präzipitieren.

[0075] Die Menge des osteogenetischen Proteins hängt von der Größe der zu verwendenden Vorrichtung und von der spezifischen Aktivität des osteogenetischen Proteins ab. Größere Mengen können für größere Implantate verwendet werden. Klinische Zubereitungen für große Knochendefekte umfassen gegenwärtig ungefähr 2,5 mg osteogenetisches Protein pro Gramm Kollagenmatrix.

1. Ethanol-Trifluoressigsäure-Lyophilisation

[0076] In diesem Verfahren wird das osteogenetische Protein in einer Ethanol-Trifluoressigsäurelösung (47,5% EtOH/0,01% TFA) solubilisiert und dem Trägermaterial zugesetzt. Die Aufschlämmung wird gemischt und dann lyophilisiert. Dieses Verfahren wird gegenwärtig bevorzugt.

2. Acetonitril-Trifluoressigsäure-Lyophilisation

[0077] Dies ist eine Variation des obigen Verfahrens unter Verwendung einer Acetonitril-Trifluoressigsäure (ACN/TFA) Lösung, um das osteogenetische Protein zu solubilisieren, das dann dem Trägermaterial zugesetzt wird. Die Proben werden kräftig viele Male vorgetext und dann lyophilisiert.

3. Ethanolpräzipitation

[0078] Die Matrix wird osteogenetischem Protein zugesetzt, das in Guanidin-HCl gelöst wird. Die Proben werden gevortext, bei einer niedrigen Temperatur (beispielsweise 4°C) inkubiert und erneut gevortext. Kalter absoluter Ethanol (5 Volumina) wird dem Gemisch zugesetzt, das dann gerührt und inkubiert wird, vorzugsweise für 30 Minuten bei –20°C. Nach Zentrifugation (Mikrofuge, hohe Geschwindigkeit) wird der Überstand verworfen. Die rekonstituierte Matrix wird zwei Mal mit kaltem konzentriertem Ethanol in Wasser (85% EtOH) gewaschen und darauf lyophilisiert.

4. Urea-Lyophilisierung

[0079] Für solche osteogenetischen Proteine, die in Ureapuffer hergestellt werden, wird das Protein mit dem Matrixmaterial gemischt, viele Male gevortext und dann lyophilisiert. Das lyophilisierte Material kann dann für Implantate „wie es ist" verwendet werden.

5. Puffer-Lyophilisierung

[0080] Osteogenetische Proteinzubereitungen in einem physiologischen Puffer können ebenfalls mit der Matrix gevortext und lyophilisiert werden, um osteogenetisch aktive Zubereitungen zu produzieren.
[0081] Darüber hinaus können die hierin beschriebenen Verfahren dazu verwendet werden, andere aktive therapeutische Arzneistoffe, Hormone und verschiedene bioaktive Spezies an die Matrix für die Zwecke einer verzögerten Freisetzung zu adsorbieren. Beispielsweise können zusätzlich zu den osteogenetischen Proteinen verschiedene Wachstumsfaktoren, Hormone, Enzyme, therapeutische Zusammensetzungen, Antibiotika oder andere bioaktive Mittel an ein Substrat adsorbiert oder mit diesem imprägniert und über die Zeit hinweg freigesetzt werden, wenn sie implantiert sind und die Matrix langsam absorbiert wird. Somit können verschiedene bekannte Wachstumsfaktoren wie beispielsweise EGF; PDGF, IGF, FGF, TGF-α und TGF-ß in vivo freigesetzt werden. Die Matrix kann ebenfalls dazu verwendet werden, chemotherapeutische Mittel, Insulin, Enzyme, Enzyminhibitoren oder Chemotaktische-Chemoattraktant-Faktoren freizusetzen.

IV. Sterilisation

[0082] Im Anschluss an die Formulierung werden die sich ergebenden osteogenetischen Vorrichtungen durch Exposition gegenüber ionisierender Strahlung sterilisiert, beispielsweise durch Exposition gegenüber einem Elektronenstrahl oder gegenüber Gammabestrahlung. Weil Sauerstoffionen mit hoher Energie und Sauerstoffradikale aus Sauerstoffatomen, die mit der Vorrichtung verbunden sind, erzeugt werden können, wird restliche Luft aus der Vorrichtung vor der Bestrahlung entfernt.
[0083] Jede Verpackungsform kann verwendet werden, um die osteogenetische Vorrichtung der Erfindung in sich zu tragen, vorausgesetzt, dass die Verpackung mit dem Sterilisationsverfahren und der Aufrechterhaltung der Sterilität unter Lagerbedingungen kompatibel ist. Verschlossene Vials werden vorzugsweise zur Verpackung der erfindungsgemäßen Vorrichtungen verwendet.
[0084] Die Sterilisation wird routinemäßig durchgeführt, nachdem die Vorrichtung in einem Vial versiegelt wurde. Im gegenwärtigen Ansatz wird die Luft aus dem Vial mittels eines Vakuums vor dem Versiegeln evakuiert. Als zusätzliche Vorsichtsmaßnahme jedoch kann das evakuierte Vial mit einem Inertgas befällt werden, beispielsweise mit Helium, Neon, Argon oder Stickstoff, bevor es versiegelt wird. Alternativ kann das Vial einfach mit einem Inertgas durchspült werden, bevor es versiegelt wird.
[0085] Die versiegelten Vorrichtungen werden anschließend durch Exposition gegenüber beispielsweise einem Elektronenstrahl oder Gammabestrahlung terminal sterilisiert. Die Vorrichtungen können während der Herstellung sterilisiert werden, das heißt als ein integraler Inline-Schritt im Herstellungsverfahren oder alternativ können die Vorrichtungen, wenn sie einmal hergestellt sind, an kommerzielle Sterilisationsdienste versandt werden, beispielsweise zu Isomedix (Northboro, MA) oder RTI-Process Technology (Rockaway, NJ) zur Bestrahlung.
[0086] Die Vorrichtungen der Erfindung werden typischerweise mit einer Dosis bestrahlt die ausreicht, um ein Sterilitätssicherheitsniveau von ungefähr 10^{-6} bereitzustellen, wie es von der Federal Drug Administration zur Sterilisierung biomechanischer Vorrichtungen angefordert wird. Die tatsächlichen Dosierungen, die zum Sterilisieren einer speziellen Vorrichtung notwendig sind, können in einfacher Weise durch Konsultieren des Referenztextes „Association for the Advancement of Medical Instrumentation Guidelines", veröffentlicht 1992, bestimmt werden. Die Guidelines werden hierin zur Bestimmung der Strahlungsdosis bereitgestellt die notwendig ist, um ein vorgegebenes Sterilitätssicherheitsniveau für eine spezielle biologische Belastung der Vorrichtung zu erreichen. Die Dosierungen der sterilisieren Vorrichtungen der Erfindung liegen vorzugsweise im Bereich von ungefähr 0,5 bis ungefähr 4,0 Megarad und am meisten bevorzugt innerhalb des Bereichs von ungefähr

2,0 bis ungefähr 3,5 Megarad.

Beispiele

[0087] Die Mittel zur Herstellung und Verwendung der osteogenetischen Vorrichtungen der Erfindung ebenso wie andere Materialaspekte, die die Natur und Nützlichkeit dieser Zusammensetzungen betreffen schließen ein, wie der beanspruchte Gegenstand herzustellen und wie er zu verwenden ist, und wird weiter aus dem nachfolgenden verständlich werden, das die beste gegenwärtig ins Auge gefasste Art und Weise darstellt, die Erfindung auszuführen. Es wird klar sein, dass die Erfindung nicht auf eine solche beispielhafte Arbeit oder auf die speziellen Einzelheiten, die in diesen Beispielen dargelegt sind, beschränkt ist.

Beispiel 1 Bioaktivität einer terminal sterilisierten osteogenetischen Vorrichtung, die OP-1 und Rinderkollagenträgermaterial umfasst

[0088] Die mineralisierte, Guanidin-extrahierte Rindermatrix wurde mit zunehmenden Mengen OP-1 unter Verwendung der wie hierin beschriebenen Ethanol/TFA-Vorschrift zubereitet. Kurz gesagt wurde OP-1 in Ethanol/TFA mit Rinderkollagenträgermatrixmaterial für 3 Stunden inkubiert. Das Gemisch wurde als eine OP-1/Matrixaufschlämmung eingefroren und unter Vakuum getrocknet. Nach Formulierung wurde jede Vorrichtung in Glas-Vials übertragen und Wasser wurde einigen der Vorrichtungen zugesetzt. Darauf wurden die Vorrichtungen mit Helium 5 Minuten lang vor dem Versiegeln gespült bzw. gereinigt. Die Vials wurden mit Kunststofftrennwänden verschlossen und versiegelt. Die Proben wurden mit 2,5 Megarad Gammastrahlung unter einer der nachfolgenden Bedingungen bestrahlt: Trocken auf Trockeneis, nass bzw. feucht auf Trockeneis oder Trocken bei Raumtemperatur.

[0089] Die sich ergebenden Vorrichtungen wurden bezüglich des knochenproduzierenden Potentials in subkutanen Ratten-Assays evaluiert. Eine in vivo Knocheninduktion wurde wie von Sampath et al. (siehe oben) beschrieben untersucht. Kurz gesagt wurden terminal sterilisierte Vorrichtungen subkutan in Empfängerratten unter Ätheranästhesie implantiert. Männliche Long-Evans-Ratten, im Alter von 28-32 Tagen, wurden verwendet. Ein vertikaler Einschnitt (1 cm) wurde unter sterilen Bedingungen in der Haut über der Thoraxregion durchgeführt und eine Tasche durch stumpfes Präparieren hergestellt. Ungefähr 25 mg der Testvorrichtung wurden tief in die Tasche implantiert und der Einschnitt mit einer metallischen Hautklammer verschlossen. Der Tag der Implantation wurde als Tag null des Experimentes bezeichnet. Die Implantate wurden am Tag 12 entfernt. Die heterotrope Stelle erlaubt eine Studie der Knocheninduktion ohne der möglichen Zweideutigkeiten, die sich aus der Verwendung orthotroper Stellen ergeben.

[0090] Die knocheninduzierende Aktivität wurde biochemisch mittels eines alkalischen Phosphataseassays und des Kalziumgehalts des Tag 12-Implantats bestimmt. Die alkalische Phosphataseaktivität wurde spektrophotometrisch nach Homogenisierung des Implantats bestimmt. Implantate, die keine Knochenentwicklung durch Histologie zeigen wiesen keine oder nur geringe alkalische Phosphataseaktivität unter diesen Assaybedingungen auf. Der Assay ist zur Quantifizierung und zur Gewinnung einer Einschätzung der Knochenbildung rasch nachdem die Implantate aus der Ratte entfernt werden, von Nutzen. Der Kalziumgehalt ist andererseits der Menge an Knochen, die im Implantat gebildet wurde, proportional. Die Knochenbildung wird deswegen durch Bestimmung des Kalziumgehalts des Implantats am Tag 12 in Ratten bestimmt.

[0091] Erfolgreiche Implantate sind dadurch gekennzeichnet, dass sie ein kontrolliertes Fortschreiten durch die Stadien der Protein-Induzierten Ersatzknochenbildung zeigen, einschließlich: (1) vorübergehende bzw. transiente Infiltration polymorphkerniger Leukozyten am Tag eins; (2) Migration und Proliferation mesenchymaler Zellen an den Tagen zwei und drei; (3) Knorpelauftreten an den Tagen fünf und sechs; (4) Knorpelmatrixbildung am Tag sieben; (5) Knorpelcalcifizierung am Tag acht; (6) vaskuläre Invasion, Auftreten von Osteoblasten und Bildung von neuem Knochen an den Tagen neun und zehn; (7) Auftreten von Osteoklasten, eine Knochenumformung und Lösung der implantierten Matrix an den Tagen zwölf bis achtzehn; und (8) hämatopoetische Knochenmarksdifferenzierung in den Ossikeln am Tag einundzwanzig.

[0092] Eine histologische Sektion und Färben wurden durchgeführt, um das Ausmaß der Osteogenese in den Implantaten zu bestimmen. Die Implantate wurden in Bouins-Lösung fixiert, in Parafin eingebettet und zu 6-8 µm Schnitten zerschnitten. Das Färben mit Toluidinblau oder Hämatoxylin/Eosin zeigt klar die letztendliche Entwicklung von Ersatzknochen. Tag-Zwölf-Implantate sind üblicherweise ausreichend um zu bestimmen, ob die Implantate neu induzierten Knochen enthalten. Die Ergebnisse der Assays sind in den Tabellen 1 bis 4 nachstehend zusammengefasst.

Tabelle 1

Vorrichtung formuliert ohne OP-1/ mit 25 mg Kollagen				
	Keine Bestrahlung	2,5 Megarad Strahlung (Heliumdurchspülung)		
		trocken/ Rmtemp.	trocken/ Trockeneis	feucht/ Trockeneis
Ca^{2+} µg/mg Gewebe	2,9 ± 1,9 (3)	2,5 ± 2,3 (4)	7,9 ± 9,7 (5)	8,9 ± 8,6 (3)
Histologie % Knochen	1,3 ± 1,1 (3)	0 (4)	0 (5)	0 (3)
Alk. Phos. Einheiten/ mg/30 min.	0,15 ± 0,08 (3)	0,16 ± 0,03 (4)	0,10 ± 0,05 (5)	0,05 ± 0,02 (3)
Gewicht mg (1/2 Implantat)	96,1 ± 7,8 (3)	48,0 ± 21,5 (4)	65,2 ± 18,2 (5)	81,5 ± 21,2 (3)

Tabelle 2

Vorrichtung formuliert mit 500 ng OP-1/25 mg Kollagenmatrix				
	Keine Bestrahlung	2,5 Megarad Strahlung (Heliumdurchspülung)		
		trocken/ Rmtemp.	trocken/ Trockeneis	feucht/ Trockeneis
Ca^{2+} µg/mg Gewebe	27,0 ± 4	8,5 ± 5,8 (5)	20,8 ± 10,8 (6)	24,7 ± 10,0 (5)
Histologie % Knochen	60 ± 8 (4)	30 ± 20 (5)	43 ± 29 (6)	50 ± 28 (5)
Alk. Phos. Einheiten/ mg/30 min.	1,02 ± 0,28 (4)	1,00 ± 0,47 (5)	1,15 ± 0,29 (6)	0,93 ± 0,21 (5)
Gewicht mg (1/2 Implantat)	95,9 ± 11,6 (4)	80,2 ± 17,5 (5)	95,3 ± 22,0 (6)	90,4 ± 29,5 (5)

Tabelle 3

Vorrichtung formuliert mit 1.000 ng OP-1/25 mg Kollagenmatrix				
	Keine Bestrahlung	2,5 Megarad Strahlung (Heliumdurchspülung)		
		trocken/ Rmtemp.	trocken/ Trockeneis	feucht/ Trockeneis
Ca^{2+} µg/mg Gewebe	37,0 ± 7,8 (5)	19,9 ± 3,6 (5)	25,3 ± 10,5 (5)	29,6 ± 6,4 (5)
Histologie % Knochen	64 ± 11 (5)	52 ± 27 (5)	47 ± 33 (5)	46 ± 29 (5)
Alk. Phos. Einheiten/ mg/30 min.	1,33 ± 0,37 (5)	1,33 ± 0,60 (5)	1,21 ± 0,63 (5)	1,40 ± 0,37 (5)
Gewicht mg (1/2 Implantat)	149,1 ± 37,8 (5)	84,6 ± 16,7 (5)	97,9 ± 25,0 (5)	105,5 ± 14,2 (5)

Tabelle 4

Vorrichtung formuliert mit 2.500 ng OP-1/25 mg Kollagenmatrix				
	Keine Bestrahlung	2,5 Megarad Strahlung (Heliumdurchspülung)		
		trocken/ Rmtemp.	trocken/ Trockeneis	feucht/ Trockeneis
Ca^{2+} µg/mg Gewebe	44,6 ± 14,9 (5)	29,0 ± 4,0 (5)	25,9 ± 11,7 (5)	46,4 ± 8,7 (5)
Histologie % Knochen	78 ± 13 (5)	74 ± 5 (5)	54 ± 21 (5)	78 ± 4 (5)
Alk. Phos. Einheiten/ mg/30 min.	0,95 ± 0,19 (5)	1,32 ± 0,28 (5)	0,99 ± 0,21 (5)	1,43 ± 0,11 (5)
Gewicht mg (1/2 Implantat)	205,4 ± 47,5 (5)	87,4 ± 25,5 (5)	133,6 ± 44,1 (5)	142,0 ± 13,2 (5)

[0093] Die in den Tabellen 1 bis 4 dargelegten Daten zeigen, dass die osteogenetische Vorrichtung durch Gammastrahlung sterilisiert werden kann, wie es durch die Beibehaltung der biologischen Aktivität der OP-1 enthaltenden Vorrichtungen bewiesen wird. Eine Abnahme des osteogenetischen Potentials war in einigen Gruppen ersichtlich. Im Allgemeinen wurde die höchste Beibehaltung an Aktivität in den feuchten Proben bemerkt, die auf Trockeneis bestrahlt wurden.

Beispiel 2 Alternative Verfahren zur Entfernung von Luft aus osteogenetischen Vorrichtungen

[0094] Beispiel 1 zeigt, dass unter bestimmten Umständen, Gammastrahlen die Bioaktivität der bestrahlten Vorrichtung reduzieren kann. Diese Ergebnisse können sich aus einer unvollständigen Entfernung von Luft aus den Vorrichtungen vor der Bestrahlung ergeben. In dem Versuch, die Reduktion der Bioaktivität zu minimieren, wurden unterschiedliche Ansätze verwendet, um Luft aus den Vorrichtungen vor der Bestrahlung zu entfernen.
[0095] In einem ersten Verfahren wurden die Vorrichtung enthaltenden Vials auf weniger als 100 µm Hg unter Verwendung eines Lyophilisators und Halten der Vials unter diesen Bedingungen für 5 Minuten vor dem Versiegeln evakuiert. Beim zweiten Verfahren wurden die Vorrichtung enthaltenden Vials auf weniger als 100 µm Hg in einem Lyophilisator evakuiert, und die Proben für 5 Minuten unter diesen Bedingungen gehalten und dann wurden die Vials mit Helium für 2 Minuten vor dem Versiegeln gespült. Die sich ergebenden Proben wurden mit 2,5 Megarad Gammastrahlung bestrahlt und anschließend bezüglich ihrer biologischen Aktivität unter

Verwendung des subkutanen Ratten-Assays untersucht, wie es in Beispiel 1 beschrieben ist. Die Ergebnisse sind in Tabelle 5 zusammengefasst.

[0096] Eine Schädigung des Trägermatrixmaterials wurde durch Extrahieren der Matrix mit PBS bestimmt und die Extinktion der sich ergebenden Lösung wurde zur Bestimmung der Menge an solubilisiertem Protein gemessen. Die ausgewählten Extrakte wurden bezüglich der Aminosäurezusammensetzung untersucht, was nahe legt, dass die solubilisierten Proteine aus Kollagen stammten und zwischen 1-2% des Ausgangsträgermatrixmaterials repräsentierten.

Tabelle 5

Wirkung unterschiedlicher Ansätze zur Entfernung von Luft aus den Vorrichtungen vor Bestrahlung						
Assay	µg OP-1/25 mg Träger	Bestrahlungsbedingungen[1]				
		Keine Bestrahlung	Vakuum RT	Vakuum Trockeneis	Helium RT	Helium Trockeneis
Ca^{2+} µg/mg Gewebe	0	0	0	0	0	0
	0,5	23 ± 13	14 ± 12	5 ± 4	4 ± 5	13 ± 7
	2,5	39 ± 11	25 ± 18	23 ± 7	30 ± 10	35 ± 9
Histologie % Knochen	0	0	0	0	0	0
	0,5	55 ± 33	29 ± 33	45 ± 26	36 ± 31	55 ± 22
	2,5	93 ± 5	63 ± 27	88 ± 4	83 ± 22	96 ± 50
Gewicht Tag-12-Implantat(mg)	0	110 ± 84	150 ± 73	85 ± 24	105 ± 43	61 ± 34
	0,5	152 ± 23	121 ± 46	114 ± 46	99 ± 28	121 ± 32
	2,5	294 ± 91	193 ± 54	188 ± 53	171 ± 25	266 ± 31

[1] Alle Vorrichtungen außer der Kontrolle wurden mit 2,5 Megarad Gammastrahlung sterilisiert.

[0097] Die Ergebnisse zeigen, dass Vorrichtungen, die nach Durchspülen mit Helium auf Trockeneis bestrahlt wurden, die höchsten Niveaus an Bioaktivität beibehielten. Die Ergebnisse zeigen jedoch an, dass Vorrichtungen, die unter Vakuum bei Raumtemperatur bestrahlt wurden, ebenfalls signifikante Bioaktivitätsniveaus aufwiesen.

Beispiel 3 Reproduzierbarkeit terminal sterilisierter Vorrichtungen

[0098] Fünf Gruppen von Vorrichtungen wurden unter Verwendung der Standardformulierungsvorschrift hergestellt. Kurz gesagt wurde OP-1, solubilisiert in 47,5% Ethanol/0,01% TFA mit Rinderkollagenträgermatrixmaterial für 3 Stunden inkubiert. Das Gemisch wurde als eine OP-1/Matrixaufschlämmung eingefroren und unter einem Vakuum getrocknet. Nach Formulierung wurde jede Vorrichtung auf Glas-Serum-Vials übertragen und die Vials unter Vakuum versiegelt und mit 2,5-3,0 Megarad Gammastrahlung sterilisiert. Alle Vorrichtungen wurden bei 4°C in Glasformulierungsgefäßen formuliert. Die Ergebnisse, die das Ausmaß der Bin dung von OP-1 an die Matrizes und die Wiedergewinnung von OP-1 aus den bestrahlten und nicht bestrahlten Vorrichtungen zeigen, sind in Tabelle 6 dargelegt.

[0099] Die Menge an OP-1, die nach 3 Stunden Inkubation (vor Lyophilisierung der Vorrichtung) in Lösung verblieb war vom Verhältnis von OP-1 zur Trägermatrix, die in der Formulierung verwendet wurde, abhängig. Je höher die Konzentration an OP-1, desto kleiner die Fraktion an OP-1, die an die Matrix gebunden war. Wenn 2,5 mg OP-1 mit einem Gramm Matrix formuliert wurden, das zur Formulierung einer Vorrichtung für die klinischen Versuche verwendete Verhältnis, wurden zwischen 53 und 64% des OP-1 nach 3 Stunden Inkubation an die Matrix gebunden. Die Menge an OP-1, die an der Vorrichtung vor und nach Sterilisation gewonnen wurde, ist von Gruppe zu Gruppe der Vorrichtung beständig, was wiederum die Reproduzierbarkeit der Vorrichtungsproduktion zeigt.

Tabelle 6

Vorrichtung formuliert mit OP-1					
Vorrichtungsnummer	mg OP-1/g Matrix	Gruppengröße	% OP-1 gebunden bei 3 Stunden	% OP-1 gewonnen aus Vorrichtung[1]	
				nicht bestrahlt	bestrahlt
P002-3,4M15D1	3,12	5 g	44	86	44
P003-1M15D1	1,25	1 g	91	86	
P003-1M15D2	2,50	1,5 g	53	79	56
P003-1M15D3	5,00	1 g	33	74	
Vorrichtung Gruppe Nr. 1	2,50	5,9 g	61	83	55

[1] Proben aus jeder der Vorrichtungen wurden mit 8 M Urea, 0,3% Tween 80, 0,1 M NaCl und 50 mM Tris, pH 8,0 für 30 Minuten bei Raumtemperatur extrahiert. Teilmengen der Extrakte wurden auf ihren OP-1-Gehalt unter Verwendung einer HPLC untersucht.

[0100] Die in den Beispielen 1-2 dargelegten Daten legen nahe, dass unter bestimmten Strahlungsbedingungen die biologische Wirksamkeit der Vorrichtung abnehmen kann. Diese Experimente wurden ausgedehnt, um Vorrichtungen zu evaluieren, die in höheren Gewichtsverhältnissen von OP-1 zu Kollagenmatrixträgermaterial formuliert wurden. Die Wirkungen der Bestrahlung auf die biologische Aktivität der formulierten Vorrichtungen wurde im subkutanen Ratten-Assay evaluiert. Diese Vorrichtungen wurden mit Matrix verdünnt, speziell wurde mit bestrahlter Matrix verdünnt und eine nicht bestrahlte Matrix wurde mit nicht bestrahlter Matrix verdünnt, so dass 3,12 mg OP-1 und 25 mg Matrix in die Ratten implantiert wurden. Die Vorrichtungen wurden verdünnt, um eine Sättigung der Assays zu vermeiden. Die Ergebnisse jedes der Assays sind in Tabelle 7 dargelegt. Kein signifikanter Unterschied der biologischen Aktivität von bestrahlter zu nicht bestrahlter Vorrichtung wurde beobachtet.

Tabelle 7

Biologische Wirkstärke bestrahlter und nicht bestrahlter Vorrichtung				
Gruppe Vorrichtung	Bestrahlungsdosis (Megarad)	µg OP-1/25 mg Matrix	Biologische Aktivität	
			Ca^{2+} (µg/mg Gewebe)	Histologie[2]
P002-3M13D1	2,52-2/73	3,12	28,9 ± 4,3 (n=6)	6/6
P002-3M13D1	keine	3,12	35,2 ± 5,3 (n=6)	6/6
P002-4,5M13D4	2,80-2,99	3,12	28,6 ± 8,9 (n=6)	6/6
P002-4,5M13D4	keine	3,12	31,4 ± 14,1 (n=6)	6/6
P002-3,4M15D1	2,66-2,94	3,12	26,5 ± 13,0 (n=8)	8/8
P002-3,4M15D1	keine	3,12	31,6 ± 15,4 (n=8)	8/8

[1] Die bestrahlten OP-Vorrichtungen wurden mit bestrahlter Matrix derart verdünnt, dass 3,12 µg OP-1 und 25 mg Matrix implantiert wurden. Nicht bestrahlte Vorrichtung wurde mit nicht bestrahlter Matrix verdünnt. Diese Proben wurden im subkutanen Ratten-Assay evaluiert. Die Anzahl der Proben pro Assay ist in Klammern dargelegt.

[2] Die Histologieergebnisse werden als Zahlen von Implantaten mit histologischer Evidenz einer Knochenbildung/Gesamtzahl der Implantate evaluiert dargestellt.

Beispiel 4 Verdünnung der Formulierungen mit zusätzlichem Trägermaterial

[0101] Um weiterhin irgendwelche Veränderungen der biologischen Aktivität der Vorrichtung nach der Bestrahlung festzustellen wurden zusätzliche Studien durchgeführt, in denen bestrahlte und nicht bestrahlte Vorrichtungen mit bestrahlter Matrix und nicht bestrahlter Matrix verdünnt wurden, um Endformulierungskonzentrationen von 3,1 µg OP-1/25 mg Matrix und 1,5 OP-1/25 mg Matrix zu erzeugen.

[0102] Proben der bestrahlten und nicht bestrahlten Vorrichtungen wurden sowohl mit bestrahlter Matrix als auch nicht bestrahlter Matrix verdünnt. Die Proben wurden unter Verwendung des subkutanen Ratten-Assays ausgewertet und die Ergebnisse sind in Tabelle 8 zusammengefasst.

[0103] Die Daten veranschaulichen wiederum die biologische Potenz der bestrahlten Vorrichtung.

[0104] Ein zusätzliches Verfahren zum Messen von Veränderungen, die eine Bestrahlung der Vorrichtung begleiten, bestand darin, OP-1 aus einer bestrahlten Vorrichtung zu eluieren und dieses durch HPLC, Immunblot und Zellassays zu untersuchen. Die Ergebnisse zeigen, dass eine Bestrahlung der Vorrichtung die Menge an OP-1 um 30-50% senkt, die eluiert und durch HPLC nachgewiesen wird. Fraktionen aus der HPLC wurden gesammelt und durch Immunblot untersucht. Das post-bestrahlte OP-1 eluiert in derselben Position aus dem HPLC als die vorbestrahlte Probe, womit die Abnahme der Gewinnung nicht auf eine Veränderung in der Elutionsposition von bestrahltem OP-1 zurückzuführen ist. Proben von Vorrichtungen wurden ebenfalls mit 2% SDS extrahiert und diese Extrakte wurden durch Immunblots und in einem Zellassay untersucht. Auf Grundlage einer Immunblotanalyse von OP-1, das aus einer Vorrichtung mit SDS eluierte, Prä- und Postbestrahlung, sieht das Proteinmuster auf den Immunblots im Wesentlichen vor und nach Bestrahlung gleich aus, was demonstriert, dass keine signifikante physikalische Veränderung des Großteils des eluierten OP-1 nach der terminalen Sterilisation existiert.

[0105] Das OP-1 aus zwei Gruppen von kollagenhaltigen Vorrichtungen, Gruppennummern POO2-3M13D1 (erste Vorrichtung) und POO2-4,SMI3D4 (zweite Vorrichtung) wurden mit 2% SDS extrahier. Diese Extrakte wurden in einem Ratten-Osteoblasten angereicherten Zellassay untersucht, bei dem der Zusatz von OP-1 eine Zunahme der alkalischen Phosphataseaktivität (**Fig.** 1) verursacht. In beiden Fällen betrug die Aktivität der Extrakte aus der bestrahlten Vorrichtung ungefähr 70% der Extrakte aus den nicht bestrahlten Kontrollen. Zusätzlich betrug die Wiedergewinnung von OP-1 aus der bestrahlten Vorrichtung gegen die nicht bestrahlte Vorrich-

tung, wie durch HPLC untersucht, 75% und 68% für die Vorrichtungsgruppen Nrn. POO2-3M13D1 bzw. POO2-4,SM13D4.

Tabelle 8

Biologische Wirkstärke der Vorrichtungsgruppe Nr. 1 vor und nach Bestrahlung					
Vorrichtung		Matrixverdünnung		µg OP-1/25 mg Matrix[1]	Biologische Aktivität[2] Ca^{2+} (µg/mg Gewebe)
bestrahlt	nicht bestrahlt	bestrahlt	nicht bestrahlt		
+		+		3,12	26,5 ± 13,0
+			+	3,12	36,3 ± 17,3
	+	+		3,12	33,4 ± 7,6
	+		+	3,12	31,6 ± 15,4
+		+		1,56	30,7 ± 11,9
+			+	1,56	39,5 ± 10,9
	+	+		1,56	32,8 ± 13,0
	+		+	1,56	46,5 ± 8,6

[1] Die Vorrichtung wurde mit Matrix auf die End-OP-1-Konzentrationen verdünnt, die in dieser Tabelle dargelegt sind. Die für dieses Experiment verwendete Vorrichtung, Gruppe POO2-3,4M15D1 wurde mit 3,12 mg OP-1/g Matrix formuliert.

[2] Acht Replikate jeder Kombination wurden im subkutanen Ratten-Assay evaluiert. Ein Anteil jedes Implantats wurde zur histologischen Auswertung versendet und der Rest wurde für die Ca^{2+}-Analyse aufgearbeitet. Alle Implantate (64 von 64) zeigten einen histologischen Beweis der Knochenbildung.

Äquivalente

[0106] Die Erfindung kann in anderen speziellen Formen verkörpert werden, ohne vom Geist oder den wesentlichen Eigenschaften der Erfindung abzuweichen. Die vorliegenden Ausführungsformen sollen deswegen in jeder Hinsicht als veranschaulichend aufgefasst werden und sollen den Umfang der Erfindung, der eher durch die beigefügten Ansprüche als durch die vorhergehende Beschreibung angezeigt wird, nicht eingeschränkt werden und alle Veränderungen, die in den Bereich und die Bedeutung der Äquivalenz der Ansprüche fallen, sollen hiervon mit umfasst werden.

Patentansprüche

1. Verfahren zur Herstellung einer terminal sterilisierten knochenbildenden Vorrichtung zur Implantierung in ein Säugetier, das die folgenden Schritt umfasst:
a) Bereitstellung einer knochenbildenden Vorrichtung in einer luftarmen Umgebung, die in Kombination ein unlösliches Polymerträgermaterial und ein isoliertes, biologisch aktives knochenbildendes Protein umfasst, das zur Induktion einer Ersatzknochenbildung oder Gelenkknorpelbildung in der Lage ist, wenn es einem Säugetier implantiert wird; und
b) Aussetzen der knochenbildenden Vorrichtung aus Schritt (a) einer ionisierenden Strahlung in einer Menge, die zur Sterilisierung der Vorrichtung ausreichend ist, während die biologische Aktivität des Proteins aufrecht erhalten wird, so dass eine terminal sterilisierte knochenbildende Vorrichtung erzeugt wird, die zur Induktion einer Ersatzknochenbildung oder einer Gelenkknorpelbildung in dem Säugetier in der Lage ist.

2. Verwendung einer terminal sterilisierien knochenbildenden Vorrichtung zum Induzieren einer Ersatzknochen- oder Gelenkknorpelbildung an einem vorgewählten Ort in einem Säugetier, wobei die terminal sterilisierte knochenbildende Vorrichtung in Kombination ein unlösliches Polymerträgermaterial und ein isoliertes, biologisch aktives knochenbildendes Protein umfasst, das zum Induzieren einer Ersatzknochenbildung in der Lage ist, wenn es dem Säugetier implantiert wird, wobei die Vorrichtung durch Exposition gegenüber einer ionisierenden Strahlung in einer luftarmen Umgebung sterilisiert wird.

3. Terminal sterilisierte knochenbildende Vorrichtung, die in Kombination ein unlösliches Polymerträgermaterial und ein isoliertes biologisch aktives knochenbildendes Protein umfasst, das zum Induzieren einer Ersatzknochenbildung oder einer Gelenkknorpelbildung in der Lage ist, wenn es einem Säugetier implantiert wird, wobei die Vorrichtung durch Exposition gegenüber einer ionisierenden Strahlung in einer luftarmen Umgebung sterilisiert wird.

4. Verfahren, Verwendung oder Vorrichtung nach einem der vorhergehenden Ansprüche, wobei das Trägermaterial und das knochenbildende Protein in einem Gewichtsverhältnis im Bereich von 1 : 1 bis 250.000 : 1 (wahlweise in einem Bereich von 40 : 1 bis 50.000 : 1) kombiniert werden.

5. Verfahren, Verwendung oder Vorrichtung nach einem der vorhergehenden Ansprüche, wobei das knochenbildende Protein OP-1, OP-2, BMP-2, BMP-3, BMP-4, BMP-5, BMP-6, BMP-8, BMP-9, DPP, Vgl, Vgr-1 oder ein funktionelles Äquivalent hiervon ist.

6. Verfahren, Verwendung oder Vorrichtung nach Anspruch 1 bis 4, wobei das knochenbildende Protein OP-1 oder ein funktionelles Äquivalent hiervon ist.

7. Verfahren, Verwendung oder Vorrichtung nach einem der vorhergehenden Ansprüche, wobei das knochenbildende Protein ein Homodimer ist.

8. Verfahren, Verwendung oder Vorrichtung nach einem der vorhergehenden Ansprüche, wobei das Trägermaterial poröse Teilchen oder zusammengepresste Teilchen umfasst.

9. Verfahren, Verwendung oder Vorrichtung nach einem der vorhergehenden Ansprüche, wobei das Trägermaterial Teilchen mit einer Teilchengröße im Bereich von 70 bis 850 µm (wahlweise im Bereich von 125 bis 450 µm) umfasst.

10. Verfahren, Verwendung oder Vorrichtung nach einem der vorhergehenden Ansprüche, wobei das Trägermaterial Folgendes umfasst:

11. (a) ein in vivo biologisch abbaubares Polymer; oder

12. (b) ein synthetisches Polymer (das wahlweise Polymilchsäure, Polybuttersäure, Polyglykolsäure oder ein Gemisch hiervon umfasst); oder

13. (c) ein natürliches Polymermaterial (das wahlweise Hydroxyapatit, Tricalciumphosphat, Collagen oder ein Gemisch hiervon umfasst oder allogener oder xenogener Knochen ist).

14. Verfahren, Verwendung oder Vorrichtung nach Ansprüchen 1 bis 9, wobei das Trägermaterial Collagen umfasst.

15. Verfahren, Verwendung oder Vorrichtung nach einem der vorhergehenden Ansprüche, wobei das Trägermaterial ein bindendes Material (wahlweise Carboxymethylcellulose, Glycerol oder Polyethylenglycol) umfasst.

16. Verfahren, Verwendung oder Vorrichtung nach einem der vorhergehenden Ansprüche, wobei die ionisierende Strahlung Folgendes ist:

17. (a) Gammastrahlung oder ein Elektronenstrahl; und/oder

18. (b) in einer Dosis im Bereich von 0,5 bis 4,0 Megarad (wahlweise im Bereich von 2,0 bis 3,5 Megarad) bereitgestellt wird.

19. Verfahren, Verwendung oder Vorrichtung nach einem der vorhergehenden Ansprüche, wobei die terminal sterilisierte knochenbildende Vorrichtung ein Sterilitätssicherungsniveau von ungefähr 10^{-6} aufweist.

20. Verfahren, Verwendung oder Vorrichtung nach einem der vorhergehenden Ansprüche, wobei die terminal sterilisierte knochenbildende Vorrichtung zum Induzieren einer Gelenkknorpelbildung an einem avaskulären Ort in der Lage ist.

21. Verfahren, Verwendung oder Vorrichtung nach einem der vorhergehenden Ansprüche, wobei das Säugetier ein Mensch ist.

22. Verfahren, Verwendung oder Vorrichtung nach einem der vorhergehenden Ansprüche, wobei das knochenbildende Protein ein Mitglied der Vg/dpp Unterfamilie der TGF-β Superfamilie ist.

23. Verfahren, Verwendung oder Vorrichtung nach Anspruch 17, wobei das knochenbildende Protein ein konserviertes Sechs- oder Sieben-Cystein-Grundgerüst im Cterminalen Bereich mit anderen Mitgliedern der Vg/dpp Unterfamilie teilt.

Es folgt ein Blatt Zeichnungen

Anhängende Zeichnungen

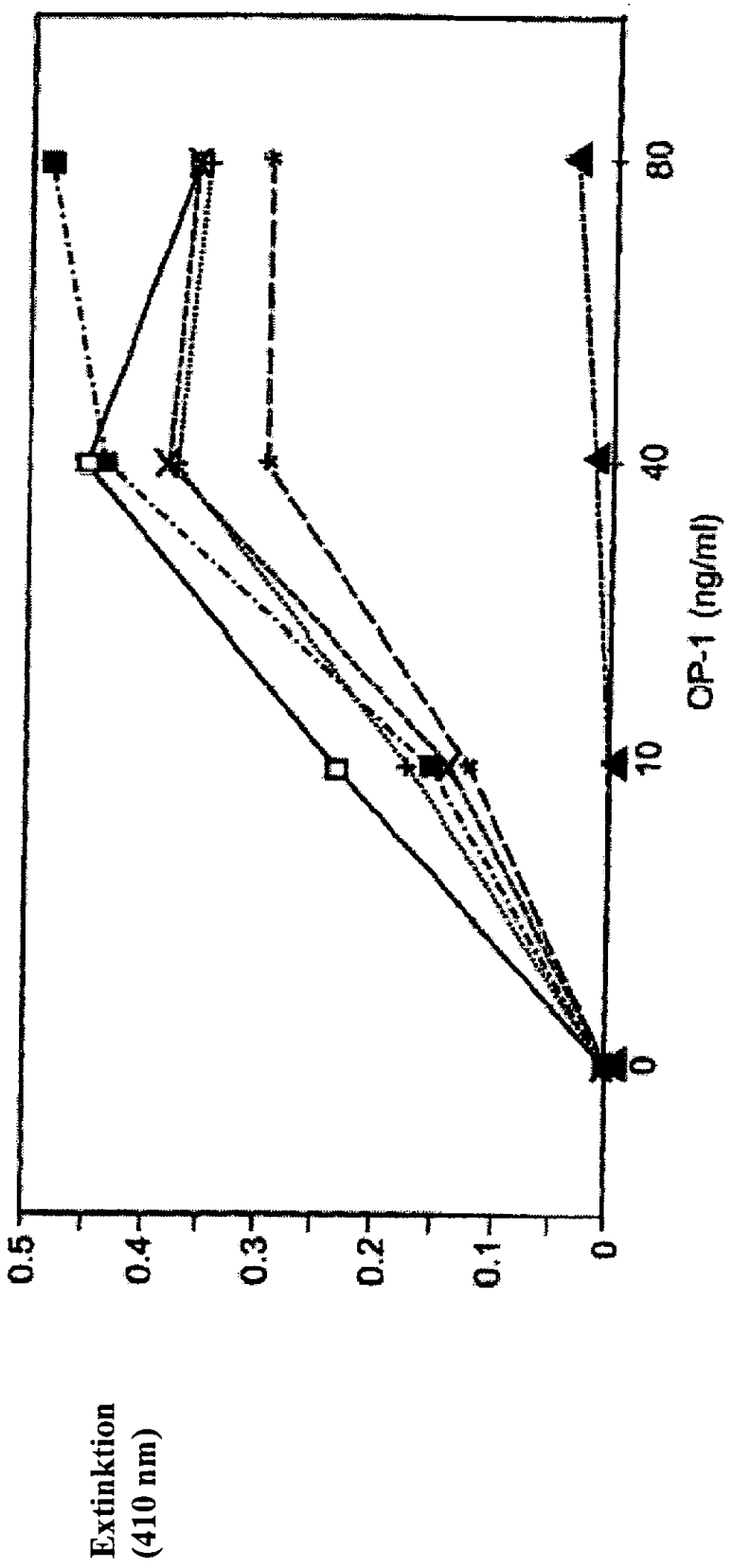


FIG. 1