



Erteilt gemäß § 17 Absatz 1 Patentgesetz  
der DDR vom 27.10.1983  
in Übereinstimmung mit den entsprechenden  
Festlegungen im Einigungsvertrag

5(51) A 61 K 6/00

DEUTSCHES PATENTAMT

In der vom Anmelder eingereichten Fassung veröffentlicht

---

(21)	DD A 61 K / 326 622 6	(22)	15.03.89	(44)	17.10.90
(31)	8800980-8	(32)	17.03.88	(33)	SE

---

(71) siehe (73)  
(72) Hammarström, Lars, Prof.; Lindskog, Sven, Dr.; Blomlöf, Leif, Dr., SE  
(73) BIORA AB Lidingö, SE  
(74) Internationales Patentbüro Berlin, Wallstraße 23/24, Berlin, 1020, DD

---

**(54) Verfahren zur Herstellung einer Zusammensetzung zur Anwendung bei der Induzierung einer Bindung zwischen Teilen von lebendem, verkalktem Gewebe durch die Regenerierung von verkalktem Gewebe an wenigstens einem der Teile**

---

(55) Zusammensetzung, bindingsinduzierend; Bindung zwischen Gewebsteilen, verkalkt; Regenerierung Gewebe; Behandlung Periodontitis

(57) Die Erfindung betrifft ein Verfahren zur Herstellung einer Zusammensetzung zur Anwendung bei der Induzierung einer Bindung zwischen Teilen von lebendem verkalktem Gewebe durch die Regenerierung von verkalktem Gewebe an wenigstens einem der Teile, das darin besteht, daß die Zahnansätze aus dem Kiefer von Säugetieren isoliert werden, aus diesen Ansätzen das Zahnschmelzorgan entfernt wird, aus den so behandelten Zahnansätzen die Zahnschmelzmatrix gewonnen wird, die Proteinfraktion aus der homogenisierten Zahnschmelzmatrix gewonnen wird und diese wahlweise mit einem Trägermittel, Verdünnungsmittel oder Bindemittel, die für den Zweck akzeptabel sind, gemischt wird. Die erfindungsgemäß hergestellte Zusammensetzung wird beispielsweise zur Behandlung von Periodontitis eingesetzt.

## Patentansprüche:

1. Verfahren zur Herstellung einer Zusammensetzung zur Anwendung bei der Induzierung einer Bindung zwischen Teilen von lebendem, verkalktem Gewebe durch die Regenerierung von verkalktem Gewebe an wenigstens einem der Teile, **dadurch gekennzeichnet**, daß die Zahnansätze aus dem Kiefer von Säuretieren isoliert werden, aus diesen Ansätzen des Zahnschmelzorgan entfernt wird, aus den so behandelten Zahnansätzen die Zahnschmelzmatrix gewonnen wird, die Proteinfraction aus der homogenisierten Zahnschmelzmatrix gewonnen wird und diese wahlweise mit einem Trägermittel, Verdünnungsmittel oder Bindemittel, die für den Zweck akzeptabel sind, gemischt wird.
2. Verfahren nach Anspruch 1, **dadurch gekennzeichnet**, daß die Isolierung aus einer Rinds- oder Schweinsquelle erfolgt.
3. Verfahren nach Anspruch 1, **dadurch gekennzeichnet**, daß die Proteinfraction als aktiver Bestandteil durch den niedrigmolekulargewichtigen Teil der Proteinfraction oder deren aktiven Determinanten gebildet wird.
4. Verfahren nach Anspruch 3, **dadurch gekennzeichnet**, daß der aktive Bestandteil durch essigsäureextrahierbare Proteine gebildet wird, die generell als Amelogenine bezeichnet werden.
5. Verfahren nach Anspruch 4, **dadurch gekennzeichnet**, daß der aktive Bestandteil ein Molekulargewicht bis zu etwa 40000 hat.
6. Verfahren nach Anspruch 5, **dadurch gekennzeichnet**, daß der aktive Bestandteil ein Molekulargewicht zwischen etwa 5000 und etwa 25000 hat.
7. Verfahren nach Anspruch 4, **dadurch gekennzeichnet**, daß der aktive Bestandteil durch die hochmolekulargewichtige Fraktion des Amelogeninteils der Zahnschmelzmatrix gebildet wird.
8. Verfahren nach Anspruch 1, **dadurch gekennzeichnet**, daß das Trägermittel, Verdünnungsmittel oder Bindemittel dental oder biologisch akzeptabel ist.
9. Verfahren nach Anspruch 8, **dadurch gekennzeichnet**, daß das Trägermittel, Verdünnungsmittel oder Bindemittel ein wasserlösliches Polymer aufweist.
10. Verfahren nach Anspruch 9, **dadurch gekennzeichnet**, daß dieses wasserlösliche Polymer durch ein Zellosederivat oder ein Alginat gebildet wird.

Hierzu 1 Seite Zeichnungen

## Anwendungsgebiet der Erfindung

Die Erfindung betrifft ein Verfahren zur Herstellung einer Zusammensetzung zur Anwendung bei der Induzierung einer Bindung zwischen Teilen von lebendem, verkalktem Gewebe durch die Regenerierung von verkalktem Gewebe an wenigstens einem der Teile, die beispielsweise zur Behandlung von Periodontitis verwendet wird

## Charakteristik des bekannten Standes der Technik

Zur Erleichterung des Verständnisses der Erfindung ist es angezeigt, eine kurze Hintergrunddarstellung der biologischen Bedingungen in Verbindung mit den Zähnen und der damit zusammenhängenden Störungen und Beeinträchtigungen zu geben. Beim normalen Dentalstatus sind die Zähne in speziellen Hohlräumen, den sogenannten Alveolen, im Kieferknochen verankert. Zwischen den Zahnwurzeln und dem Kieferknochen befindet sich die sogenannte Periodontalmembran. Die Zahnwurzeln bestehen vorwiegend aus einem Dentin genannten Material. Dieses Dentin wird außen von einer dünnen Zementschicht mit einer Stärke von etwa 0,01 bis 1 mm umschlossen. In diesem Zahnzement befinden sich u. a. Kollagenfasern, die vom Zahnzement durch die Periodontalmembran führen und im Kieferknochen verankert sind. Folglich ist der Zahnzement für den Halt des Zahnes im Kieferknochen außerordentlich wichtig. Die Periodontalmembran hat eine Stärke von etwa 0,2 mm und besteht aus den genannten Kollagenfasern und Gefäßen und Nerven, die zwischen diesen Fasern und den zu diesem Gewebe gehörenden Zellen liegen. Der Kieferknochen reicht nicht bis zur Zahnkrone, und in dem Teil der Wurzel, der nicht durch den Kieferknochen bedeckt wird, führen Fasern vom Zahnwurzelszement nach außen in das Zahnfleisch, die Gingiva. Diese Fasern unterstützen die Verankerung des Zahnes und stabilisieren außerdem das Zahnfleisch. Das Zahnfleisch wie der gesamte Mundraum sind von einer dünnen Epithelschicht bedeckt. Dieses Epithel bildet eine enge Manschette oder einen Kragen um den Zahn. Direkt an den Zähnen wird zwischen den Zähnen und dem Epithel eine flache Furche gebildet. Entzündliche Erkrankungen des Gewebes, welches die Zähne mit dem Kieferknochen verbindet, sind ziemlich häufig und betreffen im unterschiedlichen Umfang den größten Teil der Bevölkerung in der ganzen Welt. Die bisherigen Behandlungsmethoden sind vor allem darauf gerichtet, den fortschreitenden Krankheitsprozeß zu verzögern und das Lockern der Zähne weitestgehend zu verhindern. Gegenwärtig gibt es keine klinisch anwendbare Methode, die eine Heilung in dem Sinne ermöglicht, daß die Zähne wieder Halt im Kieferknochen gewinnen.

Ein weiteres Problem in diesem Bereich entzündlicher Erkrankungen stellen die angeborenen Defekte in der Zahnverankerung dar. Patienten mit solchen Defekten entwickeln bereits in sehr frühem Alter Symptome von Periodontitis, die sogenannte juvenile Periodontitis. Die Behandlung schließt oft die Exzision des Zahnes und den Ersatz durch eine kostspielige Zahnbrücke ein.

Die Bakterien auf der Oberfläche der Zähne verursachen eine chronische Entzündung des Zahnfleisches um die Zähne. Entzündliche Zellen exkretieren Enzyme, die für die Abtötung der Bakterien vorgesehen sind, in diesem Fall aber auch die Kollagenfasern angreifen, die den Zahn mit den Gingiva und dem Kieferknochen verbinden. Die Zellen auf der Oberfläche der Zahnwurzel oder des Zahnzements sind damit der Zerstörung ausgesetzt, und Epithel aus dem Mundschleimhaut wächst langs der Zahne nach unten und erzeugt den sogenannten Gingivalspalt. In diesem Spalt finden neue Bakterien günstige Wachstumsbedingungen, und neue Entzündungszellen dringen in diesen Raum ein, wodurch die Zersetzung des Gewebes bis zur Periodontalmembran fortschreiten kann. Die Zahnzementzellen sterben ab, und der Knochen des Alveolarbereiches wird zerstört. Der Prozeß verläuft im allgemeinen sehr langsam, kann aber in Intervallen sehr rasch fortschreiten. Nach einer gewissen Zeit verlieren die befallenen Zähne vollkommen ihren Halt im Kieferknochen.

Die Behandlung ist gegenwärtig prinzipiell darauf gerichtet, die Bakterienablagerungen auf der Zahnoberfläche zu beseitigen. Wenn die Bakterien entfernt werden, hört die Entzündung des Zahnfleisches und der Periodontalmembran auf und der Zersetzungsprozeß kommt zum Stillstand. Diese Behandlung ist auch darauf gerichtet, die Bildung neuer Bakterienablagerungen auf der Zahnoberfläche zu verhindern. Sie führt damit zum Stoppen der Zerstörung der Verankerung der Zähne im Kieferknochen, aber neue Periodontalmembran oder neuer Zahnzement werden im Heilungsprozeß nicht gebildet.

Im Zusammenhang mit Forschungen, deren eines Ergebnis die vorliegende Erfindung ist, wurde die Erkenntnis genutzt, daß die Bildung des Zahnzements durch eine dünne Schicht eines Vorläufers des Zahnschmelzes initiiert wird, der bei der Entwicklung der Wurzel langs der gesamten Wurzeloberfläche gebildet wird. Es ist zu beachten, daß es nicht allgemein bekannt ist, daß der Vorläufer des Zahnschmelzes die Bildung von Zahnzement induzieren kann. Diese Erkenntnis wird vielmehr in hiermit im Zusammenhang stehenden Patentanmeldungen offengelegt, beispielsweise in der europäischen Patentanmeldung Nr. 87850264 0. Weitere Forschungen und Experimente zum Mechanismus der Bildung des Zahnzements haben überraschenderweise gezeigt, daß der Vorläufer des Zahnschmelzes, die sogenannte Zahnschmelzmatrix, als aktiven Bestandteil eine Proteinfraction enthält, die aus dem organischen Teil dieser Zahnschmelzmatrix gewonnen werden kann. Diese Entdeckung ist um so überraschender, als angenommen wird, daß die biologische Funktion der Proteine, welche diese Proteinfraction bilden, in der Bildung und vor allem in der Verkalkung des Zahnschmelzes besteht (siehe Fischer, L., und Termine, D., *Clinical Orthopaedics* 200, 1985, 362-385). Die Proteine der Zahnschmelzmatrix setzen sich aus einem Teil mit hohem Molekulargewicht und einem Teil mit niedrigem Molekulargewicht zusammen, und es wurde festgestellt, daß der aktive Bestandteil durch dessen niedrigmolekulargewichtigen Teil gebildet wird, aber auch durch einen aktiven Determinanten davon bestimmt werden kann. Dieser Teil mit niedrigem Molekulargewicht der Zahnschmelzmatrixproteine wird von essigsäureextrahierbaren Proteinen gebildet, die im allgemeinen als Amelogenine bezeichnet werden und ein Molekulargewicht bis zu etwa 40000 haben, wobei das Molekulargewicht hauptsächlich im Bereich von 5000 bis etwa 25000 liegt.

Im Zusammenhang mit den hier verwendeten Ausdrücken „Zahnschmelzvorläufer“ und „Zahnschmelzmatrix“ wird auf zwei Quellen verwiesen, in denen die Bedeutung dieser Ausdrücke vollständig geklärt wird: Ten Cate, A. R., *Oral Histology, Development, Structure, and Function* (Oralhistologie, Entwicklung, Struktur und Funktion), The C V Mosby Co., St. Louis, USA (1980), S. 182-183.

Mjor, I. A., Fejerskov, O., *Human Oral Embryology & Histology* (Oralembryologie und -histologie des Menschen), Munksgaard, Kopenhagen (1986), S. 44-45.

Der vollständige Inhalt dieser Quellen wird in diese Offenlegungsschrift als Verweis einbezogen.

### Ziel der Erfindung

Mit der vorliegenden Erfindung wird ein neues Verfahren auf biologischer Grundlage, das bei der Induzierung einer Bindung zwischen Teilen von verkalktem Gewebe, beispielsweise Zähnen und Knochen, von Nutzen ist, bereitgestellt. Die Erfindung ist generell anwendbar, um eine solche Bindung herbeizuführen, wird jedoch in der vorliegenden Offenlegungsschrift vor allem in Verbindung mit der Behandlung von gelockerten Zähnen, der sogenannten Periodontitis, beschrieben.

### Darlegung des Wesens der Erfindung

Der vorliegenden Erfindung liegt die Aufgabe zugrunde, ein neues Verfahren, das die Induzierung einer Bindung zwischen Teilen von verkalktem Gewebe ermöglicht, zur Verfügung zu stellen.

Erfindungsgemäß wird ein Verfahren zur Herstellung einer Zusammensetzung zur Anwendung bei der Induzierung einer Bindung zwischen Teilen von lebendem, verkalktem Gewebe durch die Regenerierung von verkalktem Gewebe an wenigstens einem der Teile bereitgestellt, das dadurch gekennzeichnet ist, daß die Zahnansätze aus dem Kiefer von Säugetieren isoliert werden, aus diesen Ansätzen das Zahnschmelzorgan entfernt wird, aus den so behandelten Zahnansätzen die Zahnschmelzmatrix gewonnen wird, die Proteinfraction aus der homogenisierten Zahnschmelzmatrix gewonnen wird und diese wahlweise mit einem Tragemittel, Verdünnungsmittel oder Bindemittel, die für den Zweck akzeptabel sind, gemischt wird. Im Zusammenhang mit der vorliegenden Erfindung wurde festgestellt, daß in dem Fall, daß Dentin den Zellen der Periodontalmembran ausgesetzt ist, beispielsweise durch Schleifen eines Hohlraumes in die Oberfläche der Wurzel, eine Heilung in Form eines knochenartigen Gewebes erfolgt, dem die Fasern fehlen, welche den gesunden Zahn mit dem umgebenden Gewebe verbinden. Wenn jedoch die Oberfläche des künstlich erzeugten Hohlraumes mit einer aktiven Proteinfraction bedeckt wird, die ihren Ursprung in einem Vorläufer des Zahnschmelzes hat, der nachstehend als Zahnschmelzmatrix bezeichnet wird, kann man feststellen, daß normales Zahnzementverankerungsgewebe gebildet wird.

Die Zahnschmelzmatrixproteine werden vorzugsweise von einem Säugetier, beispielsweise den Spezies Rind oder Schwein. Bei den Experimenten wurde festgestellt, daß man die Bildung von Zahnzement bei Affen und Menschen dadurch induzieren kann, daß ein in die Oberfläche der Zahnwurzel geschliffener Hohlraum mit einer Proteinfraction abgedeckt wird, die aus der Zahnschmelzmatrix einer anderen Spezies, beispielsweise der Spezies Schwein, gewonnen wurde.

So ermöglicht die nachstehend beschriebene Erfindung neue Methoden, um die Bindung zwischen Teilen von lebendem, verkalktem Gewebe durch die Neubildung von mineralisiertem oder verkalktem Gewebe auf wenigstens einem der Teile zu induzieren. Diese Methoden sind gekennzeichnet durch den Einsatz von Zahnschmelzproteinen, die von einem Vorläufer des Schmelzes, der sogenannten Zahnschmelzmatrix, stammen, um die Bildung zu induzieren. So sieht die Erfindung weiter eine Zusammensetzung für diese Anwendung vor, welche als aktiven Bestandteil diese Zahnfleischmatrixproteine oder einen aktiven Determinanten enthält.

Wie bereits angegeben, kann die Erfindung vor allem im Zusammenhang mit der Zahntherapie angewendet werden, beispielsweise bei der Behandlung von Periodontitis, d. h., dem Lockerwerden von Zähnen, bei der Transplantation von Zähnen oder beim Wiedereinsetzen von Zähnen, die durch einen Unfall herausgetrennt wurden. Die Erfindung kann jedoch auch angewendet werden, um die Befestigung künstlicher Implantate zu erleichtern, beispielsweise von Zahnimplantaten oder künstlichen Hüftgelenken. Die Erfindung kann auch angewendet werden, um die Bildung von verkalktem Gewebe auf künstlichen Implantaten zu induzieren, wo das zur Bildung einer neuen Sehnenbefestigung gewünscht wird.

Die Proteinfraction, die bei der Anwendung der Methoden nach der vorliegenden Erfindung eingesetzt wird, wird vorteilhaft aus der Zahnschmelzmatrix eines Säugetieres, dessen Zähne in der Entwicklung sind, gewonnen. Eine geeignete Quelle für Zahnschmelzmatrix sind Schlachttiere, beispielsweise Schweine oder Kälber, die zu einem Zeitpunkt geschlachtet werden, zu dem die Zähne noch in Entwicklung sind, bei Schweinen oft im Alter von etwa einem halben Jahr. Bevorzugte Säugetiere werden also aus den Spezies Rind oder Schwein (d. h., Rindvieh oder Schweine) ausgewählt, vorstellbar sind jedoch auch andere Spezies, beispielsweise Schafe und Nagetiere, die ständig wachsende Zähne haben. Als Alternativquelle für die Proteinfraction können auch kultivierte Zellen oder nach Methoden der Rekombinant-DNA-Technik modifizierte Bakterien, siehe beispielsweise US-PS 4672032, eingesetzt werden.

Die Zusammensetzung, die nach der Erfindung für die Therapie eingesetzt wird, kann nur aus dieser Proteinfraction oder deren aktiven Determinanten, vorteilhaft mit Wasser gemischt, bestehen, die Zusammensetzung kann die Proteinfraction aber auch in Verbindung mit einem Trägermittel, Verdünnungsmittel oder Bindemittel, beispielsweise modifizierten Zellulosen, Agar, Alginat oder Gelatine, enthalten, die für diesen Zweck geeignet sind. Für den Dentaleinsatz ist es angebracht, daß das Träger- oder Verdünnungsmittel dental akzeptabel ist. Gegenwärtig zieht man es vor, einen Trägerstoff zu verwenden, der aus wasserlöslichen Polymeren besteht. Beispiele für derartige Polymere, die aber keine Einschränkung darstellen sollen, sind Natriumkarboxyzellulose, mikrokristalline Zellulose, Hydroxyethylzellulose, Hydroxypropylzellulose, Methylzellulose, Polyakrylsäure mit hohem Molekulargewicht, Natriumalginat, Propylenglykolalginat, Xanthangummi, Guar gummi, Johannisbrotgummi, modifizierte Stärke, Gelatine, Pektin oder deren Kombinationen. Nach Einbeziehung der aktiven Proteinfraction können diese wasserlöslichen Polymere wahlweise in Gele oder Filme umgewandelt werden, wodurch Zusammensetzungen entstehen, die auf Grund ihrer vorteilhaften physikalischen Eigenschaften leicht aufzubringen sind. Die Zusammensetzung kann wahlweise Stabilisierungsmittel oder Konservierungsstoffe zum Zweck der Verlängerung der Lagerfähigkeit enthalten.

Die Erfindung sieht auch ein Verfahren für die Behandlung von Periodontitis vor, welches die Wiederherstellung der Zahnverankerung einschließt, wozu die Bildung von Zahnwurzelzement und Kieferknochen und eine physiologische Kollagenfaserverbindung zwischen diesen induziert wird. Das Verfahren ist dadurch gekennzeichnet, daß Epithel, soweit vorhanden, von der Zahnwurzel entfernt wird und anschließend eine Schicht der relevanten Proteinfraction auf die Wurzel aufgebracht wird, die aus Zahnschmelzmatrix gewonnen wurde.

Bei der bevorzugten Anwendung der Erfindung zur Behandlung von Periodontitis wird das Kollagengewebe (Gingiva), das an den Abschnitt eines befallenen Zahns angrenzt, eingeschnitten, um die Oberfläche der Wurzel freizulegen. Epithel, soweit vorhanden, wird entfernt, und die saubere Oberfläche der Wurzel wird dann mit einer Schicht der genannten Proteinfraction oder mit einer Zusammensetzung, welche diese Proteinfraction als aktiven Bestandteil enthält, überzogen, worauf das Kollagengewebe (Gingiva) repositioniert und wahlweise genäht wird, so daß die Heilung erfolgen kann.

Wie bereits erwähnt, kann die Erfindung außer bei der Behandlung von Periodontitis auch bei der Reimplantation oder Transplantation von Zähnen angewendet werden. Häufig geschieht es, daß Jugendliche im frühen Jugendalter Unfälle mit einer Dislozierung eines oder mehrerer Zähne, vor allem der Vorderzähne, haben. Werden die dislozierten Zähne rasch wieder in Position gebracht, kann eine gute Heilung mit normaler Befestigung im Kieferknochen erfolgen. In vielen Fällen kann dieses Wiedereinsetzen von dislozierten Zähnen nicht sofort ausgeführt werden und die Zähne müssen über eine Zeitspanne in einem ungeeigneten Medium außerhalb des Mundes, beispielsweise an der Luft, aufbewahrt werden. Dadurch werden die Zellen der Periodontalmembran auf der Wurzeloberfläche zerstört. Wenn der Zahn zurück an seinen Platz in den Mund gesetzt wird, bekommt er nicht wieder den physiologischen Halt und geht letztlich verloren. Bisher wurde keine Methode entwickelt, mit der eine permanente Zahnbefestigung durch Regeneration des verbindenden Gewebes erreicht werden kann.

Nach den Methoden der Erfindung aber kann die abgestorbene Periodontalmembran auf dem dislozierten Zahn auf geeignete Weise durch mechanische oder chemische Mittel entfernt werden, anschließend wird die Zusammensetzung, welche die Proteinfraction enthält oder diese darstellt, auf die nackte Oberfläche der Zahnwurzel aufgebracht. Der Zahn wird nun in die Alveole zurückgesetzt und einige Wochen leicht befestigt. Da auf die Oberfläche der Zahnwurzel die Proteinfraction oder eine diese enthaltende Zusammensetzung aufgebracht worden ist, wird eine neue Zahnzementschicht gebildet, und der Zahn erhält dadurch eine neue Befestigung.

Bei der Transplantation von Zähnen, d. h., der Übertragung von Zähnen einer Person auf eine andere, wurde festgestellt, daß das Gewebe der transplantierten Zähne durch die Immunabwehr des Empfängers angegriffen und in sehr kurzer Zeit zersetzt wird. Es wurden Versuche durchgeführt, die Transplantation zwischen immunologisch kompatiblen Personen vorzunehmen. Aber auch die Ergebnisse dieser Versuche waren entmutigend. Da die langfristige Behandlung mit Immunsuppressoren zum Zweck der Erhaltung von ein oder mehreren transplantierten Zähnen die Risiken nicht lohnt, die damit verbunden sind, gibt es bis heute keine klinisch brauchbare Methode zur Transplantation von Zähnen mit einer günstigen Langzeitprognose.

Wendet man jedoch die Verfahren nach der vorliegenden Erfindung an, ist eine solche Methode vorstellbar, und das Problem kann gelöst werden durch Entnahme der zu transplantierenden Zähne vom Spender, Entfernen der Zahnpulpa, Reinigen des Pulparaumes und Aufbringung eines Wurzelfüllmittels in den Pulparaum. Die Periodontalmembran wird mechanisch oder chemisch entfernt, und die Wurzel des Zahnes wird mit der Zusammensetzung abgedeckt, welche die aktive Proteinfraction enthält. Dann wird der Zahn an seinen neuen Platz im Mund des Empfängers eingesetzt. Der Zahn wird über eine bestimmte Zeit in einer befestigten Position gehalten, und auf Grund der Proteinfraction wird die Neubildung von endogenem, verkalktem Gewebe induziert, welches den transplantierten Zahn bedeckt und dessen Befestigung gewährleistet.

Nach einem weiteren bevorzugten Gesichtspunkt der vorliegenden Erfindung kann die Zusammensetzung, welche die aktive Proteinfraction enthält, durch ein Gewebebindemittel ergänzt werden, das auf Fibrinogen, Faktor III (einem plasmaabgeleiteten Koagulationsfaktor), und Thrombin basiert. Diese ergänzte Zusammensetzung kann aus einer Vormischung von Zahnschmelzmatrix und Fibrinogen und Faktor III hergestellt werden, wobei das Thrombin unmittelbar vor der Aufbringung der Zusammensetzung auf die Operationsstelle zugesetzt wird. Die Zusammensetzung kann wahlweise Aprotinin enthalten, um die Zersetzungsrate zu verringern. Ein geeignetes kommerzielles Erzeugnis zum Einsatz in dieser ergänzten Zusammensetzung ist Tisseel, ein aus zwei Komponenten bestehendes Fibrinmittel, das von der IMMUNO AG, Wien, Österreich, hergestellt und verkauft wird. Bei der Verwendung dieses Gewebebindemittels wird die Vormischung aus Proteinfraction, Fibrinogen, Faktor III und, wahlweise, Aprotinin mit einer Thrombinlösung gemischt, und die resultierende Zusammensetzung wird dann schnell auf die Operationsstelle gebracht. Bei der Behandlung von Periodontitis erleichtert diese Methode den chirurgischen Eingriff sehr. Auf diese Weise wird die Haftung der Zusammensetzung an der Wurzel erhöht, das Bluten wird gestoppt und die Positionierung der Mukoperiostealklappe wird wesentlich vereinfacht, während die Ausführung einer Naht entfällt.

Für den Einsatz in der ergänzten Zusammensetzung nach der Erfindung werden gegenwärtig die Produkte Zellulosederivate und Alginat, beispielsweise Karboxymethylzellulose und Natrium- oder Propylenglykolalginat, bevorzugt.

Es ist zu beachten, daß die prinzipielle Veranschaulichung der Erfindung am Beispiel der Periodontitis nicht als Einschränkung zu interpretieren ist.

#### Ausführungsbeispiele

Im folgenden wird die Erfindung in Verbindung mit speziellen Beispielen weiter veranschaulicht. Diese Beispieldarstellung erfolgt in Verbindung mit den Dentalexperimenten, die an Affen und Menschen ausgeführt wurden. Bei diesen Beispielen wird auf die beigefugte Zeichnung verwiesen.

#### Beispiel 1

##### Herstellung von Extrakten für Tierversuche

Zur Feststellung, welche Komponenten in der Zahnschmelzmatrix bei Tierversuchen aktiv sind, wurden folgende Testsubstanzen hergestellt. Alle Substanzen haben ihren Ursprung in Schweinezahnschmelzmatrix.

**E 1:** Es wurden 0,3g der Zahnschmelzmatrix (Proteingehalt 27 + 4%) in 3ml 0,9%igem NaCl aufgeschlämmt und unter Kühlen mit Eis in einem Polythron für die Dauer von einer Minute in Intervallen von 10s homogenisiert. Das Homogenisat wurde gefriergetrocknet. Ausbeute 199mg, Proteingehalt nach Lowry 47 + 2%.

**E 2:** Es wurden 0,3g der Schmelzmatrix wie oben aufgeschlämmt und homogenisiert und dann im Wasserbad 4 Minuten lang erhitzt. Die Gefrierdryingung ergab einen Ertrag von 199mg, Gehalt an löslichen Proteinen 13 + 3%.

**E 3:** Es wurden 0,3g der Substanz in 3ml 0,5M Essigsäure aufgeschlämmt, wie oben homogenisiert und dann unter Ruhren bei 4°C 24 Stunden lang für die Proteinextraktion stehengelassen. Dann wurde in Kalte 10 Minuten lang mit 10000 Umdrehungen/min zentrifugiert. Der Niederschlag wurde aufgefangen und getrocknet, die obenaufschwimmende Schicht wurde gefriergetrocknet. Ausbeute des Lyophilisats 68mg, Proteingehalt 29 + 3%.

**E 4:** Es wurden 0,3g der Zahnschmelzmatrix in 3ml 10%iger EDTA in 0,03M Tris-Puffer, pH-Wert 7,4, aufgeschlämmt und wie oben unter Kühlen homogenisiert. Dann erfolgte die Extraktion durch vierundzwanzigstündiges Ruhren in Kalte, anschließend wurde das Homogenisat in einer Kuhlzentrifuge zentrifugiert. Die obenaufschwimmende Schicht wurde anhand von destilliertem Wasser dialysiert und gefriergetrocknet. Ausbeute 11mg, Proteingehalt 33 + 2%.

**E 5:** Der Niederschlag wurde nach dem Zentrifugieren (E 4) mit etwa 10 Volumen 0,5M Essigsäure unter langsamen Ruhren in Kalte über 24 Stunden extrahiert. Dann wurde erneut zentrifugiert, und die obenaufschwimmende Schicht wurde gefriergetrocknet. Ausbeute 109mg, Proteingehalt 15 + 3%.

**E 6:** Der unter E 5 beschriebene Niederschlag vom Zentrifugieren wurde gefriergetrocknet. Ausbeute 37mg, Proteingehalt 18 + 4%.

**E 7:** Es wurden 0,3g der Zahnschmelzmatrix in 3ml 10%iger EDTA in 0,03M Tris-Puffer, pH-Wert 7,4, mit 0,4mM Proteinaseinhibitor PMSF (Phenylmethylsulfonylfluorid) aufgeschlämmt und ebenso wie in Probe E 4 homogenisiert und extrahiert. Nach dem Zentrifugieren und der Dialyse wurde die obenaufschwimmende Schicht gefriergetrocknet. Ausbeute 11mg, Proteingehalt 41 + 2%.

**E 8:** Der Niederschlag vom Zentrifugieren unter E 7 wurde 48 Stunden bei niedriger Temperatur mit 0,5M Essigsäure extrahiert, zentrifugiert und die obenaufschwimmende Schicht gefriergetrocknet. Ausbeute 101mg, Proteingehalt 17 + 1%.

**E 9:** Der Niederschlag vom Zentrifugieren von E 8 wurde gefriergetrocknet. Ausbeute 40mg, Proteingehalt 30 + 3%.

Die oben unter E 1-9 gewonnenen Substanzen wurden nach Proteingehalt, Proteinmolekulargewichtsverteilung (SDS-Page mit Phast), isoelektrischem Punkt der Proteine und Kohlehydratgehalt charakterisiert.

Die scheinbare Molekulargewichtszusammensetzung von Extrakten aus der Zahnschmelzmatrix von Schweinen wird in der beigefügten Zeichnung gezeigt. Nach der SDS-Polyakrylamid-Gel-elektrophorese (SDS 8-25%, Phast, Pharmacia) wurden die Proteinbänder durch einen Laser-Abtaster (LKB Ultrosan XL) in Spitzen umgewandelt. Die Molekulargewichte werden aus der Eichung mit Protein- (14-90kDa) und Polypeptidreferenzen (2-14kDa) (Pharmacia) bestimmt. Die Diagramme werden für die Extrakte E 4 und E 5 gegeben, und diese und die anderen werden unten zusammengefaßt.

Extrakt Nr etwa	Proteinkomponenten (SDS-Page-Molekulargewichte)						
	5/12*	6/14*	10/15*	16	22	24	67 kDA
E 1	x	x	x	x	X	x	X
E 3	x	x	x		X	(x)	
E 4		x		x			X
E 5	x		x		X	(x)	
E 7		x		x			X
E 8	x		x		X	(x)	

\* Die unteren Molekulargewichte erhält man bei der Verwendung des Polypeptidsatzes die höheren bei der Verwendung des Proteinsatzes  
 X = große Menge, x = kleine Menge, (x) = kleinere Menge

Zweck dieses Beispiels ist es, den Einfluß der Substanzen E 1 bis E 9, die durch schrittweise Extraktion aus dem Vorlaufergewebe bis zum Zahnschmelz (Zahnschmelzmatrix) gewonnen wurden, auf den Heilvorgang von experimentell erzeugten, periodontalen Randwunden zu veranschaulichen. Defekte im Periodontalbereich von Affenzähnen wurden durch Entfernen des Zahnzementes, der Periodontalmembran und des Randes des Alveolarknochens bis auf einen Zervikal-Apikal-Abstand von etwa 5 mm mit einem Zahnbohrer geschaffen. Auf diese experimentell erzeugten Defekte wurden dann die Substanzen aufgebracht, und man ließ die Wunden ausheilen. Es wurden auch Kontrolldefekte angelegt, die ohne jede Substanz zum Ausheilen gebracht wurden. Nach einer Heilungsperiode von 8 Wochen wurden die Ergebnisse histomorphometrisch bestimmt. Die Ergebnisse des Heilungsprozesses werden in % der ursprünglichen Höhe von Zahnzement und Knochenbedeckung ausgedrückt (Tabelle 1). Der Heilprozeß besteht aus der Bildung einer anhaftenden Schicht von neuem Zahnzement, periodontaler Membran und Alveolarknochen (neue Verbindung).

**Tabelle 1**

Substanz	Kontrolle	E 1	E 2	E 3	E 4	E 5	E 6	E 7	E 8	E 9
Heilung (%)	5	93	3	79	4	49	2	0	48	5

Die Befestigung erfolgte also nach Einsatz der Substanzen E 1, E 3, E 5 und E 8. Nicht der Fall war das bei der Kontrolle und Zahnen, die mit den Substanzen E 2, E 4, E 6, E 7 und E 9 behandelt worden waren, bei denen die Defekte weiterhin bestanden und die Zähne nur mit Oralepithel bedeckt waren. Diese Ergebnisse zeigen, daß die Aufbringung des niedermolekulargewichtigen Teils der Proteinfraction der Zahnschmelzmatrix die Gewebefestwachsung bei der Behandlung von Periodontitis fordert.

**Beispiel 2**

**Herstellung eines entsalzten Säureextrakts von Zahnschmelzmatrix**

Ein ähnliches Präparat wie im vorstehenden Beispiel (E 3), das gefriergetrocknet war, wurde in 0,1 M Essigsäure aufgelöst und (144 mg/12 ml) auf eine 15 x 540 mm-Kolonnie mit Sephadex G-25 Superfine in 0,1 M Essigsäure übertragen. Die erste proteinreiche Fraktion (E 10) wurde aufgefangen und gefriergetrocknet. Die Ausbeute betrug 34 mg Material, das etwa 72% Protein enthielt, was 85% der Proteine im Ausgangsmaterial entspricht. Die restlichen Proteine waren in der Salzfraction (63 mg) des gefriergetrockneten Materials mit einem Proteingehalt von etwa 7% enthalten. Die auf diese Weise hergestellte gefriergetrocknete Proteinfraction wurde in 10-ml-Ampullen (jeweils 20 mg) gefüllt und vor dem Einsatz im Tierversuch strahlensterilisiert (35 kGy). Die Präparate wurden wie im vorstehenden Beispiel analysiert, die Ergebnisse werden in der Tabelle 2 gegeben.

**Tabelle 2**

Substanz	Kontrolle	E 10
Heilung (%)	4	72

**Beispiel 3**

**Herstellung von gereinigten Proteinfractionen**

Es wurden 200 mg gefriergetrocknetes Präparat E 3 (mit dem im Beispiel 2 verwendeten identisch) in 20 ml 0,1 M Essigsäure aufgelöst und einer 25 x 780 mm Kolonne mit Sephadex G-75 in 0,1 M Essigsäure bei 4°C zugeführt. Die Kolonne wurde mit einer Rate von 55 ml/h eluiert, und es wurden 4-ml-Proben aufgefangen. Das Eluat wurde bei 280 nm (Uvicord) überwacht, und die Proben, welche den Hauptteil des eluierten Materials enthielten, wurden kombiniert und ergaben fünf Fraktionen, die durch Elektrophorese (SDS-Page) auf ihre Molekulargewichtsverteilung analysiert wurden, wie das unten gezeigt wird. Es ergaben sich fünf Spitzen aus dem Eluierungschromatogramm (0-1 A).

**Fraktion Probe**

- (1) 50-60 Proteine mit hohem Molekulargewicht, "Enameline" (Molekulargewicht > 40 000)
- (2) 62-80 Amelogenin mit hohem Molekulargewicht (Molekulargewicht etwa 25 Kilodalton)
- (3) 90-100 Amelogenin mit einem dazwischenliegenden Molekulargewicht (Molekulargewicht etwa 14 Kilodalton)
- (4) 110-125 Amelogenin mit niedrigem Molekulargewicht (Molekulargewicht etwa 5-10 Kilodalton)
- (5) 130-160 Salze

Nach dem Gefrier-trocknen ergaben die Spitzen (2), (3) und (4) 10 mg, 7 mg bzw. 12 mg der hochmolekulargewichtigen, zwischenmolekulargewichtigen bzw. niedrigmolekulargewichtigen Amelogeninproteine (Proteingehalt > 90%). Zweck dieses Experiments war es, den Einfluß von Amelogenin-substanzen mit hohem, mittlerem und niedrigem Molekulargewicht, die aus dem Vorlaufergewebe von Zahnschmelz (Zahnschmelzmatrix) extrahiert worden waren, auf die Heilung von experimentellen Periodontalrandwunden zu zeigen. Die experimentellen Defekte im Randperiodontium von Affenzähnen wurden dadurch herbeigeführt, daß Zahnzement, Periodontalmembran und Alveolarrandknochen auf einen Zervikal-Apikal-Abstand von etwa 5 mm mit einem Zahnbohrer entfernt wurden. Anschließend wurden auf die experimentell herbeigeführten Defekte die Substanzen aufgebracht, und man ließ die Wunden heilen. Es wurden auch Kontrolldefekte ausgeführt, die ohne jede Anwendung einer Substanz ausheilen konnten. Nach einer Heilungsperiode von 8 Wochen wurden die Ergebnisse histomorphometrisch ausgewertet (Tabelle 3).

**Tabelle 3**

Substanz	Kontrolle	Hoch-	Mittel-	Niedrigmolekular-
			gewichtiges Amelogenin	
Heilung (%)	4	78	21	15

Eine neue Verbindung ergab sich also nach dem Einsatz von hochmolekulargewichtigem Amelogenin und, im geringeren Umfang, nach der Anwendung von mittel- und niedrigmolekulargewichtigem Amelogenin. Diese Ergebnisse zeigen, daß die Anwendung der hochmolekulargewichtigen Fraktion des aus der Zahnschmelzmatrix gewonnenen Amelogenins am wirksamsten die Gewebeverbindung bei der Behandlung von Periodontitis fordert.

**Beispiel 4**

**Herstellung des Saurextrakts von Zahnschmelzmatrix**

Unterkiefer von geschlachteten Schweinen (etwa 6 Monate alt, Schlachtgewicht etwa 80 kg) wurden vom Weichgewebe befreit und im Schlachthof eingefroren. Aus den gefrorenen Kieferhälften wurden geeignete Zahnkeime nach dem partiellen Auftauen herausgezogen und die Zahnschmelzmatrix isoliert.

Es wurden 38 g der Zahnschmelzmatrix in 780 ml 0,5 M Essigsäure, pH-Wert 4,1, aufgeschlammt und unter Kühlen in Eis homogenisiert (Homogenisator Polytron PT 10-30). Das Homogenisat wurde im Kalten 22 Stunden lang gerührt, um das Protein zu extrahieren, das bei einem pH-Wert von etwa 4 löslich ist. Unlösliches Material wurde auszentrifugiert, und die Essigsäurelösung wurde gefriergetrocknet.

Man erhielt etwa 8,5 g Lyophilisat mit einem Proteingehalt von etwa 20%, was einer Proteinausbeute von etwa 50% entspricht. Der gefriergetrocknete Extrakt wurde nach Wassergehalt, Azetatgehalt, Proteingehalt (Lowry), Kohlehydratgehalt (Antron-Reagens), Aminosäurezusammensetzung, Elementaranalyse, Molekulargewichtsverteilung des Proteins (SDS-Page) und isoelektrischem Punkt des Proteins analysiert.

Vor der Anwendung in der klinischen Erprobung wurde die proteinhaltige Essigsäurelösung in sterile 10-ml-Ampullen sterilgefiltert und unter sterilen Bedingungen gefriergetrocknet.

Zweck dieses Beispiels war es, den Einfluß der Substanz E3 auf die Heilung bei der Behandlung von Randperiodontitis beim Menschen zu zeigen. Nach der Bestätigung durch die schwedische medizinische Behörde und den regionalen Ethikausschuß wurde die Zusammensetzung als Hilfsmittel bei der herkömmlichen chirurgischen Behandlung von Patienten mit Randperiodontitis eingesetzt. Die Patienten wurden operiert, um Zahnstein und Granulationsgewebe zu entfernen. Die Substanz E3 wurde auf die bloßen Wurzeloberflächen „aufgestrichen“ und mit einer Mukoperiostalklappe bedeckt. Die Heilungsergebnisse wurden durch regelmäßige klinische Inspektion, Aufzeichnung der Taschentiefe, Befestigungsstand und Zahnfleischindex sowie Untersuchung von Röntgenaufnahmen des Mundinnenraumes ausgewertet. Die Ergebnisse wurden mit denen früherer quantitativer Untersuchungen verglichen, die bei herkömmlichen chirurgischen Periodontaleingriffen und ähnlichen Kontrollbereichen bei denselben Patienten gemacht worden waren.

Die Ergebnisse zeigten, daß die Substanz E3 eine wesentliche Zunahme der Höhe des Alveolarrandknochens (im Bereich von 4 bis 8 mm) und des Befestigungsstatus' (Bereich 5 bis 9 mm) bewirkt hatte. Das war ein Heilungsergebnis, das bei einem herkömmlichen chirurgischen Periodontaleingriff nie erreicht worden war. Die Heilung schien insgesamt schneller voranzugehen, sowohl hinsichtlich des klinischen Aussehens als auch der Verringerung der Randtaschentiefe, als bei früheren Untersuchungen zu herkömmlichen chirurgischen Periodontaleingriffen. Diese Ergebnisse zeigen, daß die niedrigmolekulargewichtige Proteinfraction der Zahnschmelzmatrix die Fähigkeit hat, eine neue Befestigung des Periodontalgewebes beim Menschen zu fordern, ein bei herkömmlicher Behandlung bisher nicht erreichtes Ergebnis.

**Tabelle 4**  
**Analysen des Homogenisats der Zahnschmelzmatrix und der aus dem Homogenisat der Zahnschmelzmatrix gewonnenen Proteinfraktionen**

Analyse	Homogenisat der Zahnschmelzmatrix (E 1)	Saure-extrakt (E 3)	Entsalzter Extrakt (E 10)	Salzfraktion (Beispiel 2)
<b>Elementaranalyse (%-Gew./Gew.)</b>				
C	11,3	31	50,4	ND
H	1,7	4,4	6,8	ND
N	3,9	4,5	15,5	0,7
O	9,4	27,5	21	ND
S	0,2	0,35	1,3	0,1
Cl	5,5	0,6	< 0,1	1,3
P	8,8	3,5	0,1	1,3
Ca	11,9	12	< 0,1	31,6
K	0,2	0,4	< 0,1	ND
<b>Proteingehalt %-Gew./Gew.</b>				
Lowry-Analyse	23	20	72	< 4
Aminosäureanalyse	< 23	< 26	< 90	ND
<b>Kohlehydratgehalt (%-Gew./Gew.)</b>				
Antron-Reagens	ND	0,4	1,3	ND
<b>Wassergehalt (Gew.-%/Gew.)</b>				
Karl-Fischer-Titrierung	ND	2	6	ND
<b>Azetatgehalt (Gew.-%/Gew.)</b>				
GC-Methode	ND	38	4	ND
<b>Aminosäureanalyse (Rest-Gew.-%/Gew. der Gesamtreste)</b>				
Pro	ND	18,0	19,0	ND
Glu	ND	17,8	19,0	ND
Leu	ND	9,0	9,1	ND
His	ND	8,7	9,2	ND
Ser	ND	4,8	4,6	ND
Gly	ND	3,2	2,8	ND
Tyr	ND	6,4	5,3	ND
Thr	ND	3,6	3,4	ND
Val	ND	3,6	3,5	ND
Met	ND	4,3	5,3	ND
Ile	ND	3,5	3,6	ND
Asp	ND	3,6	3,0	ND
Phe	ND	3,8	3,7	ND
Ala	ND	1,6	1,5	ND
Lys	ND	2,5	1,8	ND
Arg	ND	3,0	2,5	ND
Trp	ND	2,6	2,5	ND
Cys	ND	0	0	ND

#### **Verbesserung der Knochenheilung**

Die Wirkung des „niedrigmolekulargewichtigen Teils der Proteinfraktion der Zahnschmelzmatrix“ auf die Knochenheilung wurde an experimentellen Hohlräumen im Unterkiefer und Oberschenkel von erwachsenen Ratten getestet. Die Winkelabschnitte der Unterkiefer wurden durch einen senkrechten chirurgischen Schnitt in der Haut und dem Kaumuskel freigelegt. Durch den Unterkieferknochen wurde unter einem konstanten Fluß physiologischer Kochsalzlösung ein kleines Loch (2mm Durchmesser) gebohrt. Auf die gleiche Weise wurden Löcher derselben Größe durch den kompakten Knochen im Distalbereich des Oberschenkelknochens gebohrt. In die rechten Unterkieferknochen und in die rechten Oberschenkelknochen wurde der „niedrigmolekulargewichtige Teil der Proteinfraktion der Zahnschmelzmatrix“ eingebracht, während die Löcher in den linken Unterkieferknochen und den linken Oberschenkelknochen als Kontrollhohlräume dienten.

„Der niedrigmolekulargewichtige Teil der Proteinfraktion der Zahnschmelzmatrix“ wurde in die Hohlräume entweder als gefriergetrocknetes, schwammartiges Material oder in Form von kleinen Gelatinezylindern eingebracht. Die Kontrolllöcher in den Unterkiefer- und Oberschenkelknochen auf der linken Seite der Ratten, bei denen die Substanz in Gelatinezylindern enthalten war, wurden mit Gelatinezylindern ohne den „niedrigmolekulargewichtigen Teil der Proteinfraktion der Zahnschmelzmatrix“ gefüllt. In die Kontrolllöcher in den Unterkiefer- und Oberschenkelknochen auf der linken Seite der Ratten, welche mit trockener, gefriergetrockneter Substanz des „niedrigmolekulargewichtigen Teils der Proteinfraktion der Zahnschmelzmatrix“ behandelt worden waren, wurde nichts gegeben.

Die Ratten wurden ein bis fünf Wochen nach der Anwendung der Substanzen getötet. Die experimentellen und die Kontrollabschnitte wurden entfernt und für die lichtmikroskopische Untersuchung vorbereitet.

Bereits eine Woche nach der Einbringung des niedrigmolekulargewichtigen Teils der Proteinfraktion der Zahnschmelzmatrix in das gebohrte Loch war dieses vollkommen mit Knochen gefüllt, und außerdem war eine ausgeprägte periosteale Apposition des Knochens eingetreten. In den Kontrollöchern, die nicht nach der Erfindung behandelt worden waren, hatte sich ebenfalls neue Knochen gebildet, es war aber merklich weniger, und das gebohrte Loch war nicht ausgeheilt.

