



(19)
Bundesrepublik Deutschland
Deutsches Patent- und Markenamt

(10) **DE 698 14 352 T3** 2009.08.13

(12) **Übersetzung der geänderten europäischen Patentschrift**

(97) **EP 0 957 943 B2**

(21) Deutsches Aktenzeichen: **698 14 352.3**

(86) PCT-Aktenzeichen: **PCT/US98/02159**

(96) Europäisches Aktenzeichen: **98 904 920.0**

(87) PCT-Veröffentlichungs-Nr.: **WO 1998/034655**

(86) PCT-Anmeldetag: **05.02.1998**

(87) Veröffentlichungstag

der PCT-Anmeldung: **13.08.1998**

(97) Erstveröffentlichung durch das EPA: **24.11.1999**

(97) Veröffentlichungstag

der Patenterteilung beim EPA: **07.05.2003**

(97) Veröffentlichungstag

des geänderten Patents beim EPA: **26.11.2008**

(47) Veröffentlichungstag im Patentblatt: **13.08.2009**

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

A61K 38/18 (2006.01)

C07K 14/51 (2006.01)

A61K 48/00 (2006.01)

Patentschrift wurde im Einspruchsverfahren geändert

(30) Unionspriorität:

37327 P **07.02.1997** **US**

47909 P **29.05.1997** **US**

(73) Patentinhaber:

Stryker Corp., Kalamazoo, Mich., US

(74) Vertreter:

Vossius & Partner, 81675 München

(84) Benannte Vertragsstaaten:

**AT, BE, CH, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LI,
LU, MC, NL, PT, SE**

(72) Erfinder:

**RUEGER, David C., Southborough, US; TUCKER,
Marjorie M., Holliston, US**

(54) Bezeichnung: **MATRIXLOSE OSTEOGENE VORRICHTUNGEN UND IMPLANTATE UND VERFAHREN ZU DEREN VERWENDUNG**

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

Daten der weitergeführten Anmeldung

[0001] Diese Anmeldung basiert auf vorausgehenden Anmeldungen, U.S.S.N. 60/037,327 (Atty. Dock. Nr. CRP-111PR), eingereicht am 7. Februar 1997, und U.S.S.N. 60/047,909 (Atty. Dock. Nr. CRP-147PR), eingereicht am 29. Mai 1997.

Gebiet der Erfindung

[0002] Das Ziel der Erfindung ist in den Ansprüchen definiert.

[0003] Die hier offenbarte Erfindung betrifft Stoffe und ihre Verwendung für die Herstellung eines Medikaments für die Reparatur von Knochendefekten unter Verwendung von knochenbildenden Proteinen.

Hintergrund der Erfindung

[0004] Eine Klasse von Proteinen wurde jetzt identifiziert, die kompetent sind, als echte chondrogene Gewebemorphogene zu wirken und allein in der Lage sind, die Proliferation und Differenzierung von Vorläuferzellen in funktionelles Knochen-, Knorpel-, Sehnen- und/oder ligamentales Gewebe zu induzieren. Diese Proteine, die hier als "knochenbildende Proteine" oder "morphogene Proteine" oder "Morphogene" bezeichnet werden, umfassen Mitglieder der Familie von morphogenen Proteinen des Knochens (BMPs), die ursprünglich durch ihre Fähigkeit identifiziert wurden, die ectopische, endochondrale Knochenmorphogenese zu induzieren. Die knochenbildenden Proteine werden im Stand der Technik im Allgemeinen als Untergruppe der TGF- β -Superfamilie von Wachstumsfaktoren (Hogan (1996) *Genes & Development* 10: 1580–1594) klassifiziert. Mitglieder der Familie der Proteine der Morphogene umfassen das knochenbildende Protein-1 der Säuger (OP-1, auch bekannt als BMP-7, und das Drosophila-Homologe 60A), das knochenbildende Protein-2 (OP-2, auch bekannt als BMP-8), das knochenbildende Protein-3 (OP-3), BMP-2 (auch bekannt als BMP-2A oder CBMP-2A, und das Drosophila-Homologe DPP), BMP-3, BMP-4 (auch bekannt als BMP-2B oder CBMP-2B), BMP-5, BMP-6 und sein murines Homologes Vgr-1, BMP-9, BMP-10, BMP-11, BMP-12, GDF3 (auch bekannt als Vgr2), GDF8, GDF9, GDF10, GDF11, GDF12, BMP-13, BMP-14, BMP-15, GDF-5 (auch bekannt als CDMP-1 oder MP52), GDF-6 (auch bekannt als CDMP-2), GDF-7 (auch bekannt als CDMP-3), das Xenopus-Homologe Vg1 und NODAL, UNIVIN, SCREW, ADMP und NEURAL. Mitglieder dieser Familie codieren sezernierte Polypeptidketten, die gemeinsame strukturelle Eigenschaften haben, einschließlich der Prozessierung von einer Vorläufer-"pro-Form", um eine reife Polypeptidkette zu ergeben, die zur Dimerisierung in der Lage ist und die am Carboxy-Terminus eine aktive Domäne von etwa 97–106 Aminosäuren hat. Alle Mitglieder haben ein konserviertes Muster von Cysteinen in dieser Domäne und die aktive Form dieser Proteine kann entweder ein Disulfid-verknüpftes Homodimeres eines einzigen Mitglieds der Familie sein oder ein Heterodimeres von zwei verschiedenen Mitgliedern (vgl. z. B. Massague (1990) *Annu. Rev. Cell. Biol.* 6: 597; Sampath et al. (1990) *J. Biol. Chem.* 265: 13198). Vgl. auch U.S. 5,011,691; U.S. 5,266,683, Ozkaynak et al., (1990) *EMBO J.* 9: 2085–2093, Wharton et al., (1991) *PNAS* 88: 9214–9218), (Ozkaynak (1992) *J. Biol. Chem.* 267: 25220–25227 und U.S. 5,266,683); Celeste et al., (1991) *PNAS* 87: 9843–9847); (Lyons et al., (1989) *PNAS* 86: 4554–4558). Die Offenbarungen beschreiben die Aminosäure- und DNA-Sequenzen ebenso wie die chemischen und physikalischen Charakteristika dieser knochenbildenden Proteine. Vgl. auch Wozney et al. (1988) *Science* 242: 1528–1534; BMP 9 (WO93/00432, veröffentlicht am 7. Januar 1993); DPP (Padgett et al. (1987) *Nature* 325: 81–84; und Vg-1 (Weeks (1987) *Cell* 51: 861–867). WO95/33502, FR-A-2564732 und EP-A-0321277 offenbaren knochenbildende Zusammensetzungen, die eine Matrix umfassen.

[0005] Somit wurden echte knochenbildende Proteine nunmehr identifiziert, isoliert und cloniert, die in der Lage sind, die vorstehend beschriebene Kaskade von morphogenen Ereignissen zu induzieren, die in endochondraler Knochenbildung resultieren. Ob natürlicherweise vorkommend oder synthetisch hergestellt, von diesen knochenbildenden Faktoren ist gezeigt worden, dass sie, wenn sie in Verbindung mit einer herkömmlichen Matrix oder einem herkömmlichen Substrat, das die Anheftung, Proliferation und Differenzierung von migratorischen Vorläuferzellen erlaubt, in einen Säuger implantiert werden, die Rekrutierung von zugänglichen Vorläuferzellen induzieren und ihre Proliferation stimulieren und damit die Differenzierung in Chondrocyten und Osteoblasten induzieren und weiterhin die Differenzierung von intermediärem Knorpel induzieren, die Vaskularisierung, die Knochenbildung, die Remodellierung und letztlich die Markdifferenzierung. Darüber hinaus haben zahlreiche Anwender die Fähigkeit von diesen knochenbildenden Proteinen gezeigt, wenn sie entweder Matrixmaterial von natürlichen Quellen wie Kollagen oder synthetisch hergestellten polymerem Matrixmaterial zugemischt werden, dass sie die Knochenbildung induzieren, einschließlich der endochondralen Knochenbil-

derung unter Bedingungen, wo sonst kein echter Knochenersatz stattfinden würde. Wenn diese knochenbildenden Proteine zum Beispiel mit einem Matrixmaterial kombiniert werden, induzieren sie die Bildung von neuem Knochen bei: großen segmentalen Knochendefekten, spinalen Fusionen und Brüchen. Ohne Ausnahme beschreibt jede der vorstehend beschriebenen Offenbarungen Implantieren oder Verabreichung der knochenbildenden Proteine an der defekten Stelle durch Verpacken, Füllen und/oder Einwickeln der defekten Stelle mit einem Gemisch aus knochenbildendem Protein und Matrix, wobei das relative Volumen und die Oberfläche der Matrix von Bedeutung sind. Im Falle von nicht einheitlichen Defekten, die nicht spontan heilen, war es bisher herkömmliche Praxis, Volumen von Gemischen aus Matrix-knochenbildendem Protein an der defekten Stelle zu implantieren, mit ausreichenden Volumen zur Füllung des Defekts, um eine 3-dimensionale Gerüst für die anschließende Bildung von neuem Knochen bereitzustellen. Während Standardknochenbrüche spontan und ohne Behandlung heilen können, war es in dem Maße, in dem im Stand der Technik die Behandlung von Brüchen mit knochenbildenden Proteinen in Betracht gezogen wurde, Praxis im Stand der Technik, knochenbildende Proteine zusammen mit einer Matrix lokal an einer defekten Stelle bereitzustellen, um die Heilung zu fördern.

[0006] Während das Implantieren eines Volumens an Matrix im herkömmlichen Sinn, vor allem im Fall von nicht heilenden, nicht einheitlichen Defekten, klug sein kann, können sich bei gewissen Patienten als Resultat dieser Praxis klinische Konsequenzen entwickeln. Zum Beispiel können Patienten, denen wiederholte Konstruktionen oder Defektreparaturen widerfahren, oder bei denen das Matrixvolumen groß ist, schädliche immunologische Reaktionen gegen Matrices entwickeln, die von Kollagen abgeleitet sind. Kollagenmatrices können gereinigt werden, aber Reste von Verunreinigungen können verbleiben, die für gewisse Patienten stark allergen sind. In einer anderen Ausführungsform kann entmineralisierte autogene, allogene oder xenogene Knochenmatrix anstelle von Kollagen verwendet werden. Eine solche Matrix ist Kollagen mechanisch überlegen und kann in einigen Fällen schädliche Immunreaktionen verhindern, aber die richtige Herstellung ist teuer, zeitaufwendig und die Verfügbarkeit von zuverlässigen Quellen für Knochen kann beschränkt sein. Solche Matrices aus natürlichen Quellen können durch inerte Materialien wie Plastik ersetzt werden, aber Plastik ist kein geeigneter Ersatz, da es nicht resorbiert und auf Anwendungen beschränkt ist, die einfache geometrische Konfigurationen erfordern. Bis jetzt wurden auch biologisch abbaubare Polymere und Copolymere als Matrices zur Reparatur nicht einheitlicher Defekte verwendet, denen knochenbildende Proteine beigemischt waren. Während solche Matrices einige der vorstehenden Unzulänglichkeiten überwinden können, erfordert die Verwendung solcher Matrices immer noch die Bestimmung und Kontrolle von Eigenschaften wie der Polymerchemie, der Teilchengröße, der biologischen Verträglichkeit und anderer Besonderheiten, die für die Anwendbarkeit kritisch sind.

[0007] Zusätzlich würden Individuen, die wegen eines erworbenen oder angeborenen Zustands eine verminderte Fähigkeit haben, Knochenbrüche oder andere Defekte zu heilen, die normalerweise eine spontane Reparatur erfahren, aus Verfahren und injizierbaren Zusammensetzungen ihren Nutzen ziehen, die die Reparatur von Knochen und/oder Sehnen verbessern, ohne ein chirurgisches Verfahren zu erfordern. Letztlich stellt eine injizierbare Formulierung auch Mittel zur Reparatur von osteochondralen oder chondralen Defekten bereit, ohne ein chirurgisches Verfahren zu erfordern.

[0008] Es verbleibt Bedarf an Mitteln, Implantaten und Verfahren zur Reparatur von Knochendefekten, die nicht auf einer Matrixkomponente beruhen. Es verbleibt ein besonderer Bedarf an Mitteln, Implantaten und Verfahren, die die Verabreichung von Knochen-induzierenden Mengen an knochenbildenden Proteinen ohne gleichzeitige Verabreichung von raumfüllenden Matrixmaterialien erlaubt, die für den Empfänger von Nachteil sein können oder biomechanisch und drehstabil nicht ideal sind. Es verbleibt Bedarf an der Bereitstellung von Verfahren und Mitteln, insbesondere injizierbaren Mitteln, die die Rate der Bildung von neuem Knochen beschleunigen und die Qualität verbessern.

[0009] Demgemäß ist es ein Ziel der vorliegenden Erfindung, die Verwendung von Zusammensetzungen für die Herstellung eines Medikaments für die Reparatur von Knochendefekten, bereitzustellen, die den Bedarf einer Zumischung von knochenbildenden Proteinen zu einer Matrix umgehen. Die vorliegende Erfindung stellt die Verwendung von matrixfreien knochenbildenden Zusammensetzungen für die Herstellung von Medikamenten für die Reparatur von nicht heilenden, nicht einheitlichen Defekten bereit, ebenso wie für die Förderung einer verbesserten Knochenbildung bei Knochenbrüchen. Diese und andere Ziele, zusammen mit Vorteilen und Eigenschaften der hier offenbarten Erfindung, werden durch die folgende Beschreibung, die folgenden Figuren und die folgenden Ansprüche anschaulich.

Zusammenfassung der Erfindung

[0010] Die vorliegende Erfindung basiert auf der Entdeckung, dass ein knochenbildendes oder für den Knochen morphogenes Protein wie OP-1, in Zumischung zu einer wässrigen Lösung als Träger und nicht einem herkömmlichen Matrixmaterial, die endochondrale Knochenbildung induzieren kann, die ausreichend ist, um segmentale Knochendefekte kritischer Größe zu reparieren. Somit überwindet diese Entdeckung die vorstehend beschriebenen Probleme, die mit herkömmlichen Materialien und Verfahren zur Reparatur von Knochendefekten einhergehen, weil sie die Eliminierung von Matrixmaterial erlaubt. Weiterhin ist diese Entdeckung angesichts der bestehenden orthopädischen und rekonstruktiven Praxis unerwartet und widerspricht dem gegenwärtigen Verständnis des Fachgebiets für die Prozesse der Knochenreparatur/-bildung.

[0011] Wie hier offenbart, wird nun anerkannt, dass ein knochenbildendes Protein einer wässrigen Lösung zugemischt wird, wie hierin definiert, um ein matrixfreies Mittel zu bilden, das, wenn es einem Säuger verabreicht wird, bei der Verbesserung der Reparatur von nicht einheitlichen Knochendefekten und Brüchen wirksam ist. Wie hier offenbart, werden Verfahren und Mittel zur Induzierung der Bildung von neuem Knochen an einer lokalen Defektstelle bereitgestellt, ohne den Bedarf der Bereitstellung einer dreidimensionalen Strukturkomponente an der defekten Stelle. Wie hier beabsichtigt, ist eine "matrixfreie" knochenbildende Vorrichtung eine Vorrichtung, die zur Zeit der Verabreichung an den Empfänger ohne Matrix ist. Es ist zu verstehen, dass der Ausdruck "Matrix" eine Strukturkomponente oder ein Substrat meint, die eine dreidimensionale Form hat und an der gewisse zelluläre Ereignisse, die in die Morphogenese des endochondralen Knochens involviert sind, ablaufen; eine Matrix wirkt als eine zeitweise Gerüststruktur für die Infiltration von Zellen, die Zwischenräume für die Anheftung, die Proliferation und Differenzierung solcher Zellen hat.

[0012] Die Erfindung stellt in einem Aspekt die Verwendung einer matrixfreien Zusammensetzung ohne Gerüststruktur für die Herstellung eines Medikaments für die Induktion von Knochenbildung in einem Säuger bereit, die ausreicht, um einen Defekt zu reparieren. Eine Ausführungsform umfasst den Schritt der Bereitstellung einer matrixfreien knochenbildenden Vorrichtung für einen defekten Ort, der einen Hohlraum definiert. Die matrixfreie Zusammensetzung kann aus knochenbildendem Protein in Zumischung zu einer wässrigen Lösung zusammengesetzt sein. Diese Zusammensetzung induziert die Bildung von neuem Knochen, welcher den defekten Ort auffüllt und dabei den Defekt repariert. Wie hier beabsichtigt, wird eine matrixfreie knochenbildende Zusammensetzung an einem defekten Ort in einem Volumen bereitgestellt, das nicht ausreichend ist, um den Hohlraum an dem defekten Ort zu füllen. In gewissen Ausführungsformen umfasst der Hohlraum ein Volumen, das zu einer endogenen oder spontanen Reparatur nicht in der Lage ist. Beispiele für Defekte, die für eine Reparatur mit dem vorliegenden Verfahren geeignet sind, umfassen segmentale Defekte mit kritischer Größe und nicht einheitliche Brüche.

[0013] In einer anderen Ausführungsform stellt die Erfindung Zusammensetzungen und ihre Verwendung für die Herstellung eines Medikaments für die Verbesserung der Reparatur eines Bruchs bereit durch die Bereitstellung der hier beschriebenen matrixfreien knochenbildenden Zusammensetzung für eine Bruchdefektstelle. Die Fähigkeit der hier beschriebenen Zusammensetzungen, die Bruchreparatur substantiell zu verbessern, einschließlich der Beschleunigung der Wachstumsrate und der Verbesserung der Qualität von neu gebildetem Knochen, hat Implikationen auf die Verbesserung der Knochenheilung bei betroffenen Individuen wie Diabetikern, Rauchern, fettleibigen Individuen und anderen, die, wegen eines erworbenen oder angeborenen Zustands, eine verminderte Fähigkeit haben, Knochenbrüche zu heilen, einschließlich Individuen mit beeinträchtigtem Blutfluß zu ihren Extremitäten.

[0014] In noch einem anderen Aspekt stellt die vorliegende Erfindung eine matrixfreie knochenbildende Vorrichtung zur Induzierung der Knochenbildung in einem Säuger bereit. Wie hier beabsichtigt, umfasst eine bevorzugte knochenbildende Zusammensetzung ein bei der Knochenbildung aktives Protein bereit, das in einer wässrigen Lösung dispergiert ist. Bevorzugte knochenbildende Proteine umfassen, sind aber nicht beschränkt auf, OP-1, OP-2, BMP-2, BMP-4, BMP-5 und BMP-6 (siehe nachstehend). Somit fehlt den Zusammensetzungen der vorliegenden Erfindung eine Gerüststruktur und sie sind im Wesentlichen frei von Matrix, wenn sie einem Säuger verabreicht werden.

[0015] Insbesondere für die Verbesserung der Reparatur eines Knochenbruchs ist in Betracht zu ziehen, dass eine geeignete Formulierung an der Bruchstelle zu dem Zeitpunkt injiziert werden kann, wenn der Bruch gerichtet wird, um die Wachstumsrate von neu gebildetem Knochen zu beschleunigen und die Qualität von neu gebildetem Knochen zu verbessern.

[0016] Die Formulierung ist eine Lösung, wie durch Kombination des Proteins mit einer sauren gepufferten

Lösung, z. B. pH 4,0–4,5, zum Beispiel einem Acetat- oder Citratpuffer.

[0017] Im Allgemeinen sind die Proteine der Erfindung dimere Proteine, die die endochondrale Morphogenese von Knochen induzieren. Knochenbildende Proteine umfassen ein Paar von Polypeptiden, die, wenn sie gefaltet sind, eine Konfiguration annehmen, die ausreichend ist, damit das resultierende dimer Protein eine morphogenetische Wirkung ausübt. Das heißt, dass knochenbildende Proteine im Allgemeinen alle der folgenden biologischen Funktionen in einer morphogenetisch sensitiven Umgebung induzieren: die Stimulierung der Proliferation von Vorläuferzellen; die Stimulierung der Differenzierung von Vorläuferzellen; die Stimulierung der Proliferation von differenzierten Zellen; und die Unterstützung des Wachstums und der Erhaltung von differenzierten Zellen. Vorläuferzellen sind nicht bestimmte Zellen, die in der Lage sind, in einen oder mehr spezifische Typen von differenzierten Zellen zu differenzieren, in Abhängigkeit von ihrem genetischen Repertoire und der Gewebespezifität der sensitiven Umgebung, in der die Morphogenese induziert wird. In der vorliegenden Erfindung können knochenbildende Proteine die morphogenetische Kaskade induzieren, die die endochondrale Knochenbildung typisiert.

[0018] Wie hier verwendet umfasst der Ausdruck "Morphogen", "Knochenmorphogen", "morphogenes Knochenprotein", "BMP", "knochenbildendes Protein" und "knochenbildender Faktor" die Klasse an Proteinen, die durch das menschliche knochenbildende Protein 1 (hOP-1) typisiert werden. Die Nucleotid- und Aminosäuresequenzen für hOP-1 werden in den SEQ ID Nrs 1 und 2 bereitgestellt. Zur Erleichterung der Beschreibung wird hOP-1 hier des Weiteren als ein repräsentatives knochenbildendes Protein bezeichnet. Es wird jedoch vom Durchschnittsfachmann auf dem Fachgebiet erkannt, dass hOP-1 lediglich ein Repräsentant der TGF- β -Unterklasse der echten Gewebemorphogene ist und in der Lage ist, als knochenbildendes Protein zu wirken, und es ist nicht beabsichtigt, die Erfindung zu beschränken. Andere bekannte und nützliche Proteine umfassen BMP-2, BMP-3, BMP-3b, BMP-4, BMP-5, BMP-6, BMP-9, BMP-10, BMP-11, BMP-12, BMP-15, GDF-1, GDF-3, GDF-5, GDF-6, GDF-7, GDF-8, GDF-9, GDF-10, GDF-11.

[0019] Wie hier beabsichtigt, umfasst diese Familie an knochenbildenden Proteinen längere Formen eines vorgegebenen Proteins ebenso wie phylogenetische, d. h. Arten- und allelische Varianten. Zusätzlich können die knochenbildenden Proteine, die bei dieser Erfindung von Nutzen sind, Formen umfassen, die verschiedene Glycosylierungsmuster und verschiedene N-Termini haben, natürlicherweise vorkommen können oder biosynthetisch abgeleitet sein können, und die durch Expression von rekombinanter DNA in prokaryontischen oder eukaryontischen Wirtszellen produziert werden können. Die Proteine sind als einzelne Art aktiv (d. h. Homodimer) oder kombiniert als gemischte Arten, einschließlich Heterodimeren.

[0020] Wenn bei der Ausführung der Erfindung das Protein in Verbindung mit einem Träger bereitgestellt wird, muß der Träger ohne Gerüststruktur sein, wie vorstehend festgestellt. Wenn ein bevorzugter Träger einem knochenbildenden Protein zugemischt wird, wird eine Vorrichtung gebildet, die im Wesentlichen frei von Matrix ist, wie hier definiert. "Im wesentlichen frei von Matrix" ist so zu verstehen, dass die trägerlose Vorrichtung, wie sie vor der Verabreichung formuliert wird, keine Substratkomponente enthält, die per se als Gerüst dient. Das heißt, dass die Vorrichtung kein Substrat enthält, das von einer exogenen Quelle eingeführt wurde und in der Lage ist, als Gerüst zu dienen. Anders ausgedrückt, ist der Träger anerkanntermaßen vor der Verabreichung wegen seiner chemischen Natur nicht in der Lage, zu der Vorrichtung eine Gerüststruktur beizutragen. Per Definition sind bevorzugte Träger biologisch verträglich, nicht starr und amorph und haben keine definierten Oberflächen. Wie hier verwendet, bedeutet "nicht starr" eine Trägerformulierung, die lose oder locker ist oder anders im Wesentlichen nicht in der Lage, eine dreidimensionale Struktur bereitzustellen oder zu bilden, die eine oder mehr definierte Oberflächen hat. Wie hier verwendet, bedeutet "amorph" das Fehlen einer definierten dreidimensionalen Form, oder einer spezifischen Gestalt, das heißt ohne besondere Gestalt oder Form oder mit einer undefinierten Gestalt oder Form. Zusätzlich tragen bevorzugte Träger kein signifikantes Volumen zu der Vorrichtung der vorliegenden Erfindung bei. Das heißt, bevorzugte Träger erlauben die Dispersion eines knochenbildenden Proteins so, dass das Endvolumen der resultierenden Vorrichtung weniger ist als das Volumen des Hohlraums an der defekten Stelle. Der Träger ist eine wässrige Lösung. Zum Beispiel können besonders bevorzugte Träger ohne Einschränkung Acetatpuffer, physiologische Salzlösungen umfassen. In einer anderen Ausführungsform könne knochenbildende Proteine allein an einer defekten Stelle bereitgestellt werden.

[0021] Zusammenfassend kann die Zusammensetzung der vorliegenden Erfindung verwendet werden, um die endochondrale Knochenbildung zu induzieren, die ausreicht, Knochendefekte zu reparieren, die nicht spontan heilen, ebenso wie die Wachstumsrate und/oder Qualität der Knochenneubildung zu erhöhen und zu verbessern, insbesondere bei der Reparatur von Brüchen. Die vorliegende Erfindung ist insbesondere geeignet für die Verwendung bei Empfängern, die allergisch gegen Kollagen oder Matrix sind. Sie ist auch besonders geeignet für die Verwendung bei Patienten, die wiederholte rekonstruktive Chirurgie benötigen ebenso wie für

Krebspatienten als eine Alternative für Rekonstruktionsverfahren unter Verwendung von Metallgelenken. Die vorliegende Erfindung ist auch für Individuen von Nutzen, deren Fähigkeit zur spontanen Knochenreparatur beeinträchtigt ist, wie Diabetiker, Raucher, fettleibige Individuen, immundefiziente Individuen und alle Individuen mit reduziertem Blutfluß zu ihren Extremitäten. Andere Anwendungen umfassen, sind aber nicht beschränkt auf, prothetische Reparatur und massive Allograftreparatur.

Ausführliche Beschreibung von bevorzugten Ausführungsformen

[0022] Um den Inhalt der beanspruchten Erfindung klarer und genauer zu beschreiben, ist es beabsichtigt, dass die folgenden Definitionen eine Anleitung bei der Bedeutung von spezifischen Ausdrücken sind, die in der folgenden geschriebenen Beschreibung und den beigefügten Ansprüchen verwendet werden.

[0023] "Knochenbildung" bedeutet die Bildung von endochondralem Knochen. Bei Menschen beginnt die Knochenbildung während der ersten 6–8 Wochen der Entwicklung des Fötus. Vorläuferstammzellen von mesenchymalem Ursprung wandern zu vorbestimmten Stellen, wo sie entweder: (a) kondensieren, proliferieren und in knochenbildende Zellen (Osteoblasten) differenzieren, ein Prozess, der im Schädel beobachtet wird und als "intramembrane Knochenbildung" bezeichnet wird; oder (b) kondensieren, proliferieren und in knorpelbildende Zellen (Chondroblasten) als Zwischenprodukt differenzieren, die anschließend von knochenbildenden Zellen ersetzt werden. Spezifischer differenzieren mesenchymale Stammzellen in Chondrocyten. Die Chondrocyten werden dann kalzifiziert, hypertrophieren und werden durch neugebildeten Knochen ersetzt, der von differenzierten Osteoblasten gemacht wird, die nun an der Stelle anwesend sind. Anschließend wird der mineralisierte Knochen extensiv umgeformt und danach von einem Knöchelchen verdrängt, das mit funktionellen Knochenmarkselementen gefüllt ist. Dieser Prozess wird bei langen Knochen beobachtet und als "endochondrale Knochenbildung" bezeichnet. Im Leben nach dem fötalen Zustand hat der Knochen die Fähigkeit zur Selbstreparatur bei Verletzung, indem er den zellulären Prozess der embryonalen endochondralen Knochenentwicklung nachahmt. Das heißt, dass mesenchymale Vorläuferstammzellen aus dem Knochenmark, Peristeum und Muskel induziert werden können, zu der defekten Stelle zu wandern und die vorstehend beschriebene Kaskade an Ereignissen zu beginnen. Dort akkumulieren sie, proliferieren und differenzieren in Knorpel, der dann von neugebildetem Knochen ersetzt wird.

[0024] "Defekt" oder "defekte Stelle", wie hier beabsichtigt, definiert einen Hohlraum, der eine Störung einer Knochenstruktur ist, die eine Reparatur erfordert. "Hohlraum" ist so verstanden, dass er einen segmentalen Defekt bedeutet. Ein Defekt kann das Resultat eines Unfalls sein, einer Krankheit, eines chirurgischen Eingriffs und/oder von prothetischem Versagen. In gewissen Ausführungsformen ist die defekte Stelle ein Hohlraum, der ein Volumen hat, das einer endogenen oder spontanen Reparatur nicht zugänglich ist. Solche Defekte werden auch als segmentale Defekte von kritischer Größe bezeichnet. Im Stand der Technik ist anerkannt, dass solche Defekte eine Lücke von etwa 3–4 cm sind, mindestens aber größer als 2,5 cm, der spontanen Reparatur unzugänglich. In anderen Ausführungsformen ist die defekte Stelle ein nicht kritischer segmentaler Defekt von etwa mindestens 0,5 cm, aber nicht mehr als etwa 2,5 cm. Im Allgemeinen sind diese zu einer gewissen spontanen Reparatur fähig, obgleich biomechanisch unterlegen derjenigen, die durch Anwendung der vorliegenden Erfindung möglich gemacht wird. Andere Defekte, die unter Verwendung der vorliegenden Erfindung einer Reparatur zugänglich sind, umfassen, sind aber nicht beschränkt auf, nicht einheitliche Brüche; Tumorsektionen; frische Brüche; ebenso wie diejenigen, die von Krankheiten wie Krebs und anderen degenerativen Knochenstörungen herrühren. "Reparatur" ist so gemeint, dass sie die Induktion einer Knochenneubildung bedeutet, die ausreichend ist, den Hohlraum an der defekten Stelle zu füllen, "Reparatur" bedeutet aber nicht oder legt zwingend ein Verfahren der vollständigen Heilung nahe, oder eine Behandlung, die zu 100% wirksam bei der Wiederherstellung eines Defekts zum physiologischen/strukturellen Zustand vor dem Defekt ist.

[0025] "Matrix" wird im Stand der Technik so verstanden, dass sie ein den Knochen leitendes Substrat bedeutet, das eine gerüstbildende Struktur hat, an die infiltrierende Zellen anheften können, proliferieren und an dem morphogenen Prozess teilhaben, der in Knochenbildung kulminiert. In gewissen Ausführungsformen kann die Matrix partikulär und porös sein, wobei die Porosität eine kritische Eigenschaft bei ihrer Wirksamkeit bei der Induktion der Knochenbildung ist, insbesondere bei der endochondralen Knochenbildung. Wie früher beschrieben, ist eine Matrix so zu verstehen, dass sie der herkömmlichen knochenbildenden Vorrichtung gewisse strukturelle Komponenten bereitstellt (d. h. bis jetzt eine poröse partikuläre Matrixkomponente wie Kollagen, demineralisierten Knochen oder synthetische Polymere umfassend), um dabei wie eine vorübergehende und resorbierbare Gerüststruktur für infiltrierende Zellen zu wirken, die Zwischenräume für Anheftung, Proliferation und Differenzierung von solchen Zellen hat. Dementsprechend bedeutet der Ausdruck "matrixfreie knochenbildende Vorrichtung" oder eine knochenbildende Vorrichtung, die "im Wesentlichen frei von Matrix" ist, eine Vorrichtung, der zum Zeitpunkt der Verabreichung an den Empfänger eine im Fachgebiet anerkannte Matrix fehlt. Dar-

über hinaus ist im Wesentlichen frei von Matrix so zu verstehen, dass, wenn eine Vorrichtung an der defekten Stelle bereitgestellt wird, kein Substrat von einer exogenen Quelle eingeführt wird, die per se als Gerüst dienen kann. Matrixfrei oder im Wesentlichen frei von Matrix ist nicht so gemeint, dass es eine endogene Matrix ausschließt, die nach der Verabreichung der hier offenbarten Vorrichtungen an der defekten Stelle induziert oder gebildet wird. Somit betrifft die Erfindung weiterhin ein Verfahren zur Induzierung der Bildung einer endogenen Matrix durch Bereitstellung der hier offenbarten matrixfreien Vorrichtungen an der defekten Stelle.

[0026] "Knochenbildende Vorrichtung" ist so zu verstehen, dass sie eine Zusammensetzung bedeutet, die ein knochenbildendes Protein umfasst, das in einem Träger dispergiert ist, der eine wässrige Lösung ist. Knochenbildende Vorrichtungen der vorliegenden Erfindung sind in der Lage, eine Knochenbildung zu induzieren, die ausreichend ist, eine defekte Stelle zu füllen, die einen Hohlraum definiert. Knochenbildende Vorrichtungen sind matrixfrei, wenn sie an der defekten Stelle bereitgestellt werden, und werden der defekten Stelle in einem Volumen verabreicht, das nicht ausreicht, den Hohlraum zu füllen, der durch die defekte Stelle definiert wird. Eine Vorrichtung kann in einer flüssigen Konfiguration vorliegen.

[0027] "Knochenbildendes Protein" oder morphogenes Protein für den Knochen wird im Allgemeinen so verstanden, dass es ein Protein bedeutet, das die volle Kaskade an morphogenen Ereignissen induzieren kann, die in der endochondralen Knochenbildung kulminieren. Wie an anderer Stelle hierin beschrieben, wird die Klasse an Proteinen durch das menschliche knochenbildende Protein (hOP1) typisiert. Knochenbildende Proteine, die bei der Ausführung der Erfindung von Nutzen sind, umfassen die bei der Knochenbildung aktiven Formen von OP1, OP2, OP3, BMP2, BMP3, BMP4, BMP5, BMP6, BMP9, DPP, Vg1, Vgr, 60A Protein, GDF-1, GDF-3, GDF-5, 6, 7, BMP10, BMP11, BMP15. In einer gegenwärtig bevorzugten Ausführungsform umfasst das knochenbildende Protein eines von: OP1, OP2, OP3, BMP2, BMP4, BMP5, BMP6, BMP9. Gewisse bevorzugte Ausführungsformen der vorliegenden Erfindung umfassen das knochenbildende Protein OP-1. Gewisse andere bevorzugte Ausführungsformen umfassen reifes OP-1 das in einer physiologischen Salzlösung solubilisiert ist. Wie woanders hier weiter beschreiben, können die knochenbildenden Proteine, die zur Verwendung bei der Erfindung der Anmelder geeignet sind, mittels Routineexperimenten unter Verwendung des auf dem Fachgebiet anerkannten und von Reddi und Sampath beschriebenen Biotests identifiziert werden.

[0028] Bei der Erfindung nützliche Proteine umfassen eukaryontische Proteine, die als knochenbildende Proteine identifiziert wurden (vgl. U.S. Patent 5,011,691, das durch Bezugnahme eingeschlossen ist), wie die OP-1-, OP-2-, OP-3- und CBMP-2-Proteine, so wie in der Aminosäuresequenz verwandte Proteine wie DPP (aus *Drosophila*), Vg1 (aus *Xenopus*), Vgr-1 (aus Maus), GDF-1 (aus Mensch, vgl. Lee (1991), PNAS 88: 4250–4254), 60A (aus *Drosophila*, vgl. Wharton et al. (1991), PNAS 88: 9214–9218), Dorsalin-1 (aus Huhn, vgl. Basler et al. (1993) Cell 73: 687–702 und GenBank-Zugangsnummer L12032) und GDF-5 (aus Maus, vgl. Storm et al. (1994) Nature 368: 639–643). BMP-3 wird auch bevorzugt. Noch andere Proteine umfassen osteogen aktive Formen von BMP-3b (vgl. Takao et al. (1996) Biochem. Biophys. Res. Comm. 219: 656–662), BMP-9 (vgl. WO95/33830), BMP-15 (vgl. WO96/35710), BMP-12 (vgl. WO95/16035), CDMP-1 (vgl. WO94/12814), CDMP-2 (vgl. WO94/12814), BMP-10 (vgl. WO94/26893), GDF-1 (vgl. WO92/00382, GDF-10 (vgl. WO95/10539), GDF-3 (vgl. WO94/15965) und GDF-7 (vgl. WO95/01802).

[0029] Bevorzugte Träger umfassen Acetatpuffer, (20 mM, pH 4,5), physiologische Salzlösung (PBS) und Citratpuffer. Im Falle von Vorrichtungen, die Träger wie Acetat und PBS umfassen, kann die Verabreichung durch Injektion in der Präzipitation gewisser knochenbildender Proteine an der Verabreichungsstelle resultieren.

[0030] Die Mittel zur Herstellung und Verwendung der Zusammensetzungen der Erfindung, ebenso wie andre materielle Aspekte bezüglich ihrer Natur und ihres Nutzens, einschließlich, wie der beanspruchte Gegenstand der Erfindung herzustellen und zu verwenden ist, wird aus dem folgenden weiter verstanden, welches die gegenwärtig als beste erachtete Ausführungsform der Erfindung darstellt.

I. BETRACHTUNGEN ZUM PROTEIN

A. Biochemische, strukturelle und funktionelle Eigenschaften von morphogenen Proteinen des Knochens

[0031] Natürlicherweise vorkommende Proteine, die hier als knochenbildende oder für Knochen morphogene Proteine identifiziert und/oder anerkannt werden, bilden eine getrennte Subgruppe innerhalb der losen evolutionären Gruppierung von Sequenzverwandten Proteinen, die als TGF- β -Superfamilie oder -Supergenfamilie bekannt sind. Die natürlicherweise vorkommenden Morphogene des Knochens haben eine substantielle Aminosäuresequenzhomologie in ihren C-terminalen Regionen (Domänen). Typischerweise werden die vorstehend erwähnten natürlicherweise vorkommenden knochenbildenden Proteine als Vorläufer translatiert, die

eine N-terminale Signalpeptidsequenz haben, typischerweise weniger als etwa 30 Reste, gefolgt von einer "pro"-Domäne, die abgespalten wird, um die reife C-terminale Domäne zu ergeben. Das Signalpeptid wird bei der Translation rasch abgespalten, an einer Spaltstelle, die bei einer vorgegebenen Sequenz unter Verwendung des Verfahrens von Von Heijne (1986) *Nucleic Acids Research* 14: 4683–4691 vorausgesagt werden kann. Die pro-Domäne ist typischerweise etwa dreimal größer als die voll prozessierte reife C-terminale Domäne. Hier betrifft die "pro"-Form eines Morphogens ein Morphogen, das ein gefaltetes Paar an Polypeptiden umfasst, von denen jedes die pro- und reife Form eines morphogenen Polypeptids umfasst. Typischerweise ist unter physiologischen Bedingungen die pro-Form eines Morphogens löslicher als die reife Form. Die pro-Form scheint die primäre Form zu sein, die von einer kultivierten Säugerzelle sezerniert wird.

[0032] Knochenbildendes Protein aus natürlicher Quelle in seiner reifen, nativen Form ist ein glycosyliertes Dimer, das typischerweise ein offenes Molekulargewicht von etwa 30–36 kDa hat, wie mittels SDS-PAGE bestimmt. Wenn reduziert, ergibt das Protein von 30 kDa zwei glycosylierte Peptiduntereinheiten, die ein apparentes Molekulargewicht von etwa 16 kDa und 18 kDa haben. Im reduzierten Zustand hat das Protein keine nachweisbare knochenbildende Aktivität. Das nicht glycosylierte Protein, das auch knochenbildende Aktivität hat, hat ein apparentes Molekulargewicht von etwa 27 kDa. Wenn reduziert, ergibt das Protein von 27 kDa zwei nicht glycosylierte Polypeptide, die ein apparentes Molekulargewicht von etwa 14 kDa bis 16 kDa haben und in der Lage sind, in einem Säuger die endochondrale Knochenbildung zu induzieren. Wie vorstehend beschrieben, umfassen besonders nützliche Sequenzen diejenigen, die die C-terminalen 102 Aminosäuresequenzen von DPP (aus *Drosophila*) umfassen, Vg1 (aus *Xenopus*), Vgr-1 (aus Maus), die OP1- und OP2-Proteine, (vgl. U.S.-Pat. Nr. 5,011,691 und Oppermann et al., ebenso wie die Proteine, die als BMP2, BMP3, BMP4 (vgl. WO88/00205, U.S.-Patent Nr. 5,013,649 und WO91/18098), BMP5 und BMP6 (vgl. WO90/11366, PCT/US90/01630) und BMP9 bezeichnet werden.

[0033] Wie vorstehend festgehalten sind bei der vorliegenden Erfindung nützliche Proteine im Allgemeinen dimere Proteine, die ein gefaltetes Paar der vorstehenden Polypeptide umfassen. Solche morphogenen Proteine sind inaktiv, wenn sie reduziert sind, sind aber aktiv als oxidierte Homodimere und wenn sie in Kombination mit anderen der Erfindung oxidiert werden, um Heterodimere zu ergeben. Somit können die Mitglieder eines gefalteten Paares von morphogenen Polypeptiden in einem morphogenen aktiven Protein unabhängig von jedem der vorstehend erwähnten spezifischen Polypeptide ausgewählt werden.

[0034] Die morphogenen Proteine des Knochens, die bei den Materialien dieser Erfindung von Nutzen sind, umfassen Proteine, die jede der vorstehend beschriebenen Polypeptidketten umfassen, entweder isoliert aus natürlicherweise vorkommenden Quellen oder hergestellt mittels rekombinanter DNA- oder anderer synthetischer Verfahren. Die Proteine können Formen umfassen, die verschiedene Glycosylierungsmuster haben, verschiedene N-Termini, hergestellt durch Expression von rekombinanter DNA in Wirtszellen.

[0035] Die hier betrachteten morphogenen Proteine des Knochens können von intakter oder verkürzter cDNA oder von synthetischen DNAs in prokaryontischen oder eukaryontischen Wirtszellen exprimiert werden, und gereinigt, gespalten, wiedergefaltet und dimerisiert werden, um morphogen aktive Zusammensetzungen zu bilden. Gegenwärtig bevorzugte Wirtszellen umfassen *E. coli* oder Säugerzellen, wie CHO-, COS- oder BSC-Zellen. Ausführliche Beschreibungen der bei der Ausführung dieser Erfindung nützlichen morphogenen Proteine des Knochens, einschließlich ihrer Herstellung, Verwendung und Testung auf knochenbildende Aktivität sind in zahlreichen Veröffentlichungen offenbart, einschließlich US-Patent Nr. 5,266,683 und 5,011,691, deren Offenbarung hier durch Bezugnahme eingeschlossen wird.

[0036] Somit können angesichts dieser Offenbarung geübte Gentechniker Gene von cDNA oder genomischen Bibliotheken zahlreicher verschiedener biologischer Arten isolieren, die geeignete Aminosäuresequenzen codieren, oder DNAs aus Oligonucleotiden konstruieren, und sie dann in verschiedenen Arten von Wirtszellen exprimieren, einschließlich Prokaryonten und Eukaryonten, um große Mengen an aktiven Proteinen zu produzieren, die in der Lage sind, die Morphogenese von endochondralem Knochen in einem Säuger zu stimulieren.

B. Die Gewinnung von morphogenem Protein des Knochens, OP-1

1. Lyophilisiertes Protein

[0037] OP-1 kann aus 20 mM Acetatpuffer, pH 4,5, mit 5% Mannitol, Lactose, Glycin oder anderen Zusatz- oder Volumenmitteln unter Verwendung von Standardlyophilisierungsprotokollen lyophilisiert werden. Von auf diese Weise wiederhergestelltem OP-1 ist beobachtet worden, dass es bei Aufbewahrung bei 4°C oder 30°C

mindestens sechs Monate biologisch aktiv ist.

[0038] OP-1 kann auch aus einem Succinat- oder Citratpuffer (oder einem anderen nicht flüchtigen Puffer) für die Wiederherstellung in Wasser lyophilisiert werden, oder von Wasser für die Wiederherstellung in 20 mM Acetatpuffer, pH 4,5.

[0039] Zum Beispiel sind flüssige Formulierungen von OP-1 in 10 und 20 mM Acetatpuffer (pH 4, 4,5 und 5) ohne Mannitol für mindestens sechs Monate stabil und osteogen aktiv.

II. BETRACHTUNGEN ZUM TRÄGER

[0040] Wie bereits erklärt, bedeutet "Träger", wie hier verwendet, ein biologisch verträgliches, nicht starres amorphes Material, das keine definierten Oberflächen hat und für die Verwendung bei den Vorrichtungen, Implantaten und Verfahren der vorliegenden Erfindung geeignet ist. Geeignete Träger sind nicht partikulär und nicht porös, das heißt porenlos. Trägern, die für die Verwendung bei der vorliegenden Erfindung geeignet sind, fehlt eine Gerüststruktur und sind im Wesentlichen matrixfrei. Somit ist "im wesentlichen frei von Matrix" auch so zu verstehen, dass es bedeutet, dass, wenn eine einen Träger enthaltende Vorrichtung an einer defekten Stelle bereitgestellt wird, kein Substrat von einer exogenen Quelle einschließlich des Trägers eingeführt wird, das per se als Gerüst wirken kann. Vor der Verabreichung an und der Implantation in den Empfänger wird von dem Träger wegen seiner chemischen Natur anerkannt, dass er im Wesentlichen nicht in der Lage ist, zu der Vorrichtung eine dreidimensionale Gerüststruktur beizutragen. Bevorzugte Träger sind zumindest vorübergehend adhärent zu Geweben wie Knochen, Knorpel und/oder Muskel. Bevorzugte Träger umfassen ohne Einschränkung Acetatpuffer, (20 mM, pH 4,5), physiologische Salzlösung und Citratpuffer. Im Falle von Vorrichtungen, die Träger wie Acetat und PBS enthalten, kann die Verabreichung mittels Injektion in einer Ausfällung gewisser knochenbildender Proteine an der Verabreichungsstelle resultieren.

III. ÜBERLEGUNGEN ZUR FORMULIERUNG UND ZUR VERABREICHUNG

[0041] Die Vorrichtungen der Erfindung können unter Verwendung von Routineverfahren formuliert werden. Alles, was erforderlich ist, ist die Bestimmung der gewünschten Endkonzentration des knochenbildenden Proteins pro Volumeneinheit an Träger, wobei man im Gedächtnis behalten muß, dass das verabreichte Volumen an Vorrichtung weniger sein wird als das Volumen des Hohlraums an der defekten Stelle. Die gewünschte Endkonzentration an Protein wird von der spezifischen Aktivität des Proteins abhängen ebenso wie von der Art, dem Volumen und/oder der anatomischen Lage des Defekts. Zusätzlich kann die gewünschte Endkonzentration an Protein vom Alter, dem Geschlecht und/oder dem Gesundheitszustand des Empfängers abhängen. Es wurde beobachtet, dass für segmentale Defekte kritischer Größe von etwa mindestens 2,5 cm Länge typischerweise 0,05 ml (oder mg) einer Vorrichtung, die 0,5 bis 1,5 mg knochenbildendes Protein enthält, eine Knochenbildung induziert, die ausreicht, um die Lücke zu füllen. Im Falle von frischen Brüchen mit Defekten nicht kritischer Größe, wurde beobachtet, dass etwa 0,1–0,5 mg Protein die Lücke oder den Defekt reparieren. Die Optimierung der Dosen erfordert nur Routineversuche und gehört zum Können eines Durchschnittsfachmanns auf dem Fachgebiet.

[0042] Wie nachstehend beispielhaft dargestellt, können die Vorrichtungen der vorliegenden Erfindung eine Vielzahl an Konfigurationen annehmen. Zum Beispiel kann eine matrixfreie knochenbildende Vorrichtung in Lösung durch Solubilisierung gewisser Formen von OP-1 in Lösungen von Acetat- (20 mM, pH 4,5) oder Citratpuffern oder phosphatgepufferter Salzlösung (PBS), pH 7,5, formuliert werden. In einigen Fällen kann das knochenbildende Protein nicht vollständig solubilisiert werden und/oder kann bei Verabreichung an der defekten Stelle ausfallen. Suspensionen, Aggregatbildung und/oder in vivo-Präzipitation beeinträchtigen nicht die Wirksamkeit der matrixfreien knochenbildenden Vorrichtung, wenn sie gemäß der hier offenbarten Erfindung durchgeführt wird. Matrixfreie Vorrichtungen in Lösung sind besonders geeignet für die Verabreichung durch Injektion, wie die Bereitstellung einer Vorrichtung an einer Bruchstelle durch Injektion statt chirurgischer Mittel.

[0043] Allgemein gesagt unterscheidet sich die Konfiguration von matrixfreien Vorrichtungen, die für die Verabreichung durch Injektion geeignet ist, von denjenigen, die für die Verwendung an einer offenen chirurgischen Stelle bevorzugt werden. Zum Beispiel sind lyophilisierte Herstellungen von matrixfreien Vorrichtungen eine gegenwärtig bevorzugte Ausführungsform für die Reparatur dieser Art von Defekt. Die vorstehend beschriebenen matrixfreien Vorrichtungen in Lösung können verwendet werden, um eine lyophilisierte Konfiguration herzustellen.

[0044] Die Ausführung der Erfindung wird noch vollständiger durch die folgenden Beispiele verstanden, die

hier nur zur Illustration dargestellt sind und keinesfalls als Beschränkung der Erfindung verstanden werden sollten.

IV. BIOLOGISCHER TEST

A. Biologischer Test auf knochenbildende Aktivität: endochondrale Knochenbildung und verwandte Eigenschaften

[0045] Im Folgenden werden innerhalb des Umfangs der Erfindung des Anmelders liegende Protokolle für die Identifikation und Charakterisierung bona fide von knochenbildenden Proteinen oder morphogenen Proteinen des Knochens ebenso wie knochenbildenden Vorrichtungen dargestellt.

[0046] Der im Stand der Technik anerkannte biologische Test für die Knochenbildung, wie beschrieben von Sampath und Reddi (Proc. Natl. Acad. Sci. USA (1983) 80: 6591–6595) und in dem US-Pat. Nr. 4,968,590, deren Offenbarung durch Bezugnahme hier eingeschlossen ist, wird verwendet, um die Wirksamkeit der Reinigungsprotokolle zu belegen. Wie nachstehend gezeigt, besteht dieser Test in der Aufbringung der Testproben auf subkutane Stellen bei allogenen Ratten unter Ätherbetäubung. In die Haut über dem Bereich des Brustkorbs wird unter sterilen Bedingungen ein vertikaler Einschnitt (1 cm) gemacht und mittels stumpfer Sektion eine Tasche hergestellt. Unter gewissen Umständen werden etwa 25 mg Testprobe tief in diese Tasche implantiert und der Einschnitt mit einem Metallclip geschlossen. Die heterotrope Stelle läßt die Untersuchung der Induktion des Knochens zu ohne mögliche Zweideutigkeiten, die bei Verwendung von orthotopen Stellen resultieren.

[0047] Die aufeinanderfolgenden zellulären Reaktionen, die an der heterotropen Stelle auftreten, sind komplex. Die vielstufige Kaskade der endochondralen Knochenbildung umfasst: Bindung von Fibrin und Fibronektin an die implantierte Matrix, Chemotaxis von Zellen, Proliferation von Fibroblasten, Differenzierung in Chondroblasten, Knorpelbildung, Einwachsen von Blutgefäßen, Knochenbildung, Ummodellierung und Knochenmarkdifferenzierung.

[0048] Bei Ratten zeigt dieses biologische Modell eine kontrollierte Progression durch die Stadien der Matrix-induzierten endochondralen Knochenentwicklung einschließlich: (1) transiente Infiltration durch polymorphonucleäre Leukocyten am Tag eins; (2) die Wanderung und Proliferation von mesenchymalen Zellen an den Tagen zwei und drei; (3) das Auftauchen von Chondrocyten an den Tagen fünf und sechs; (4) die Bildung von Knorpelmatrix am Tag acht; (5) Calcifizierung des Knorpels am Tag acht; (6) Einwachsen von Gefäßen, Erscheinen von Osteoblasten und Bildung von neuem Knochen an den Tagen neun und zehn; (7) Erscheinen von Osteoblasten- und Knochen-Ummodellierung an den Tagen zwölf bis achtzehn; und (11) hämatopoetische Knochenmarksdifferenzierung in dem Knöchelchen am Tag einundzwanzig.

[0049] Histologische Sezierung und Anfärbung wird vorgezogen, um das Ausmaß an Knochenbildung in den Implantaten zu bestimmen. Anfärbung mit Toluidinblau oder Hämotoxylin/Eosin zeigt klar die letztliche Entwicklung von endochondralem Knochen. Biologische Tests von zwölf Tagen sind üblicherweise ausreichend, um zu bestimmen, ob eine Knochen-induzierende Wirkung mit der Testprobe assoziiert ist.

[0050] Zusätzlich kann die Aktivität der alkalischen Phosphatase als Marker für die Knochenbildung verwendet werden. Die Enzymaktivität kann nach Homogenisierung des ausgeschnittenen Testmaterials spektrophotometrisch bestimmt werden. Die Aktivität hat ihren Höhepunkt an den Tagen 9–10 in vivo und nimmt danach langsam ab. Proben, die bei der Histologie keine Knochenentwicklung zeigen, sollten bei diesen Testbedingungen keine Aktivität der alkalischen Phosphatase haben. Dieser Test ist von Nutzen bei der Quantifizierung und um eine Abschätzung der Knochenbildung sehr schnell nach der Entnahme der Testproben von der Ratte zu bekommen. Es wurden zum Beispiel Proben, die knochenbildendes Protein mit mehreren verschiedenen Reinheitsstufen enthielten, getestet, um die wirksamste Dosis/den wirksamsten Reinheitsgrad zu bestimmen, um eine Formulierung zu finden, die im Industriemaßstab produziert werden könnte. Die Resultate, wie sie als Niveau der Aktivität der alkalischen Phosphatase und der histologischen Bewertung gemessen werden, können als "knochenbildende Einheiten" dargestellt werden. Eine knochenbildende Einheit stellt die Menge an Protein dar, die für die halb-maximale knochenbildende Aktivität am Tag 12 erforderlich ist. Zusätzlich können Dosis-kurven für die Knochen induzierende Aktivität in vivo bei jedem Schritt eines Reinigungsschemas konstruiert werden, indem man verschiedenen Konzentrationen an Protein testet. Dementsprechend kann der Durchschnittsfachmann repräsentative Dosiskurven unter Verwendung von lediglich Routineversuchen konstruieren.

B. Knochenbildung nach der Implantierung von knochenbildenden, matrixfreien OP-1-Vorrichtungen (Referenzbeispiel)

[0051] Knochenbildende Vorrichtungen wurden mit 62,5 µg lyophilisiertem OP-1 mit oder ohne 25 mg Kollagenmatrix hergestellt. Diese Vorrichtungen wurden nach ihrer Fähigkeit bewertet, die Knochenbildung unter Verwendung des vorstehend beschriebenen ectopischen Knochenbildungstests an der Ratte an sowohl intramuskulären als auch subkutanen Stellen zu fördern. Zusätzlich wurde die Masse an gebildetem Knochen durch Messung der Calciumgehalte und Gewichte der entfernten Vorrichtungen bewertet. Die geschaffenen Daten sind in den nachstehenden Tabellen 1 und 2 zusammengestellt.

[0052] Wie aus der Histologie und dem Calciumgehalt offensichtlich bildete sich Knochen als Antwort auf alle matrixfreien OP-1-Proben. Diese Daten zeigen, dass die Implantierung einer matrixfreien OP-1-Vorrichtung allein ausreichend ist, die endochondrale Knochenbildung an ectopischen Stellen der Ratte zu induzieren.

Tabelle 1. Knochenbildung gg. Konzentrationen von OP-1 Intramuskuläre Stelle

Vorrichtung () Probengröße		12-Tage-Implantat		
Kollagen	OP-1	Calcium µg/mg Gewebe	Implantat Gewicht, mg	Histologie % Knochen
25 mg (5)	62,5 µg	38,2–67,1		70–90
0 mg	51,7 µg	48,6	430,7 mg	90
0 mg	61,3 µg	35,8	256,1 mg	90
0 mg	18,6 µg	66,3	457,8 mg	90
0 mg	59,2 µg	53,9	580,0 mg	90
0 mg	59,5 µg	25,9	383,1 mg	90

Tabelle 2. Knochenbildung gg. Konzentrationen von OP-1 Subkutane Stelle

Vorrichtung () Probengröße		12-Tage-Implantat		
Kollagen	OP-1	Calcium µg/mg Gewebe	Implantat Gewicht, mg	Histologie % Knochen
25 mg (5)	62,5 µg	28,4–54,6	500,6–1472,6	60–80
0 mg	40,4 µg	44,4	132,7 mg	90
0 mg	36,7 µg	43,9	337,7 mg	80
0 mg	35,2 µg	37,4	310,7 mg	90
0 mg	51,0 µg	57,5	195,8 mg	90
0 mg	51,4 µg	29,7	721,9 mg	90

C. Matrixfreie OP-1-Vorrichtungen, die wasserlösliche Träger enthalten (Referenzbeispiele)

[0053] Auch OP-1, das wasserlöslichen Trägern zugemischt ist, fördert die Knochenbildung. Bei dieser Untersuchung wurden Mannitol, Carboxymethylcellulose, Dextrin, PEG3350, ein Pluronic-Gel und Kollagen durch Zugabe von 0,9%-iger steriler Salzlösung zu einer Paste formuliert. Zehn µg an in Wasser aufgelöstem OP-1 wurden zu der Paste zugegeben, um eine matrixfreie Vorrichtung herzustellen, und die Vorrichtung wurde unmittelbar intramuskulär in Ratten injiziert. Nach 12 Tagen, wurden die implantierten Vorrichtungen entfernt und mittels Calciumgehalt und Histologie auf Knochenbildung bewertet. Diese Daten bestätigen die vorstehend beschriebene Beobachtung, dass eine Kollagenmatrix für die Induktion einer volumenfüllenden Knochenbildung nicht essentiell ist. Von den bewerteten wasserlöslichen Trägern zeigt Mannitol insgesamt die besten Resultate, wobei die anderen relativ vergleichbar erschienen.

TABELLE 3

	Calcium, µg/mg Implantat	Implantat µg, mg	Histologie (%)
Mannitol	100–200	28–48	> 90
CMC	50–200	28–52	> 80–80
Dextrin	20–80	8–12	> 90
Kollagen	550–800	20–45	> 90
PEG	100–150	10–12	> 90
Pluronic	50–150	14–28	> 90

D. Matrixfreie OP-1-Vorrichtungen in Lösung

[0054] Von matrixfreien knochenbildenden Vorrichtungen in Lösung wurde auch gezeigt, dass sie die Knochenbildung induzieren, wenn sie intramuskulär (IM) oder intradermal (ID) verabreicht werden. In einem beispielhaften Experiment wurden matrixfreie OP-1-Vorrichtungen in 20 mM Acetatpuffer, pH 4,5, hergestellt. Die Vorrichtungen wurden so hergestellt, dass die gewünschte Dosis (5–50 mg) an OP-1 in 100 µl Injektionsvolumen verabreicht würde. Beide Arten der Verabreichung induzierten die Knochenbildung, wie mittels Calciumgehalt, Histologie und Explantatgewicht gemessen.

V. TIERSTUDIEN: VERFAHREN DER VERWENDUNG VON MATRIXFREIEN OP-1-VORRICHTUNGEN UND -IMPLANTATEN

A. Heilung von segmentalen Defekten kritischer Größe in Hunden unter Verwendung von matrixfreien knochenbildenden Vorrichtungen

1. Experiment 1

[0055] Die folgenden Experimente zeigen die Wirksamkeit von injizierbaren und gefriergetrockneten Formulierungen von rhOP-1 für die Heilung von segmentalen Defekten kritischer und unkritischer Größe in einem etablierten Ulna-Defektmodell des Hundes. Drei Formulierungen von matrixfreien knochenbildenden Vorrichtungen, die alle OP-1 enthielten, wurden in Defekten kritischer Größe (2,5 cm) und/oder Defekten unkritischer Größe (5 mm, 3 mm, 1,5 mm) bewertet. Wie vorstehend beschrieben, sind Defekte kritischer Größe Defekte, die nicht spontan heilen. Die drei bewerteten Formulierungen waren (1) 20 mM Acetatpufferlösung (pH 4,5); (2) phosphatgepufferte Salzlösung (PBS, etwa pH 7,5); und (3) lyophilisiertes (gefriergetrocknetes) Protein allein. Die Menge an OP-1, die an den Defekten kritischer Größe bereitgestellt wurde, war 1,75 mg; 0,35 mg Protein wurde an den Defekten mit unkritischer Größe bereitgestellt. Unmittelbar vor dem Verschluß der Wunde wurde OP-1 mit Acetat oder PBS zugemischt und dann mit insgesamt 1 ml an der defekten Stelle injiziert. Lyophilisierte Proben wurden entlang der Länge des Defekts in 5 separaten Teilmengen in diskreten, nicht zusammenhängenden Orten entlang der Länge des Defekts plaziert.

[0056] Unter Verwendung von chirurgischen Standardverfahren wurden osteoperiosteale segmentale Defekte der zuvor beschriebenen Größe bilateral in der mittleren Region der Ulna von zwanzig erwachsenen, zu diesem Zweck gezüchteten Mischlingshunden geschaffen. Alle Tiere waren zwischen einem und zwei Jahren alt, wogen 35 bis 50 Pfund und wurden von Lieferanten mit USDA-Lizenz bereitgestellt. Eine spezielle Aufmerksamkeit wurde darauf gerichtet, Tiere einheitlicher Größe und einheitlichen Gewichts auszuwählen, um Abweichungen bei der Knochengeometrie und -last zu beschränken. Die Tiere wurden vor der Operation radiographisch durchmustert, um sich der richtigen Größe und der Reife des Skeletts zu versichern und dass keine offensichtlichen Abnormalitäten der Knochen existierten. Die Tiere wurden auch klinisch überprüft, um akute und chronische medizinische Zustände während einer Quarantänezeit von zwei Wochen auszuschließen. Ein vollständiges Blutbild mit Zelldifferenzierung wurde vor der Chirurgie durchgeführt.

[0057] Die Speiche wurde wegen der mechanischen Stabilität erhalten, aber es wurde keine interne oder externe Fixierung verwendet. Die Stelle wurde mit Salzlösung gespült, um Knochensplitter und ausgetretene Markzellen zu entfernen, dann getrocknet und vor der Bereitstellung der Formulierung an der Stelle wurde Homöostase erreicht. Die weichen Gewebe wurden vor der Injektion der Formulierungen 1 oder 2 (Acetat oder PBS) sorgfältig in Schichten geschlossen. Die Vorrichtungen der Formulierung 3 (lyophilisiertes Protein allein) wurden vor der Schließung der Gewebeschichten entlang dem Raum zwischen den Knochen plaziert, um das

Implantat zu enthalten. Das Verfahren wurde dann auf der contralateralen Seite wiederholt, außer dass vor dem Wundverschluß keine OP-1-Vorrichtung bereitgestellt wurde.

[0058] Den Tieren wurden nach der Chirurgie intramuskulär vier Tage lang Antibiotika verabreicht und unmittelbar nach dem Eingriff wurden routinemäßig vorher-nachher-Radiogramme aufgenommen, um sich einer einwandfreien Platzierung zu versichern.

[0059] Die Tiere wurden nach der Operation für 24 bis 72 Stunden in 3 × 4 Erholungskäfigen gehalten, danach wurden sie in Geläufe transferiert und ihnen die uneingeschränkte Bewegung erlaubt.

[0060] Es wurden zweiwöchige Radiogramme aufgenommen, um den Fortschritt der Heilung zu untersuchen. Zusätzlich wurde zweiwöchig vor der Operation bis zur Tötung Blut (Serum) entnommen, um die Antikörperbildung durch den Sponsor zu untersuchen. Bei der Tötung wurde alle Ulnae en bloc entnommen und diejenigen, die ausreichend geheilt waren, wurden durch Torsion mechanisch getestet. Segmente wurden mittels Histologie auf Gewebeantwort, Knochenarchitektur und Ummodellierung, und Qualität und Menge an neuer Knochenbildung und -heilung bewertet.

[0061] Die Tiere wurden 4, 6, 8 oder 12 Wochen nach der Operation getötet.

1b(3). Radiogramme

[0062] Radiogramme der Vorderglieder wurden zweiwöchig bis acht Wochen nach der Operation aufgenommen und dann wiederum bei der Tötung an Woche zwölf nach der Operation. Es wurden Standardaufnahmekzeiten und -intensitäten verwendet, und es wurden Sandsäcke verwendet, um die Extremitäten in konsistenter Weise zu positionieren. Die Radiogramme wurden bewertet und mit früheren Radiogrammen verglichen, um die Qualität und Geschwindigkeit der Defektheilung einzuschätzen.

Mechanische Testung

[0063] Unmittelbar nach der Sektion, wenn die Heilung durch Befühlen mit der Hand ausreichend erschien, wurden Proben auf Versagen bei Verdrehung auf einer MTS hydraulischen Testmaschine mit geschlossenem Kreislauf (Minneapolis, MN) getestet, die unter Hubkontrolle bei einer konstanten Vorschubrate von 50 mm/Min. in einer zylindrischen Aluminiummuffe und einzementiert mit Methylmethacrylat geführt wurde, unter Verwendung des Protokolls des Herstellers. Ein Ende war starr fixiert und das andere wurde gegen den Uhrzeigersinn gedreht. Da die Ulna des Hundes eine leichte Krümmung hat, wurden die Proben exzentrisch montiert, um die Drehung der Proben coaxial mit der der Testvorrichtung zu halten. Die Torsionskraft wurde mittels eines Hebelarms von sechs cm eines servohydraulischen Materialtestsystems übertragen. Es wurden gleichzeitig Aufzeichnungen von der Verdrehung des Implantats vorgenommen, gemessen durch die Hubkontrolle der Maschine, während die Last von der Belastungszelle aufgezeichnet wurde. Die Daten wurden mittels eines Analog-Digital-Wandlers und eines PC und einer online Aufnahmesoftware aufgezeichnet. Es wurden Kurven der Kraft-Winkel-Verdrehung erzeugt, aus denen das Drehmoment und die Winkeldeformation bis zum Versagen erhalten wurden, und die Energieaufnahme bis zum Versagen als die Fläche unter der Last-Verdrehungskurve berechnet wurde.

Ergebnisse

[0064] Die Knochenheilungscharakteristika, mechanische Stärke und Histologie von Ulna-Defekten kritischer Größe, die mit rhOP-1 ohne Trägermaterial behandelt worden waren, waren ähnlich denen von Defekten, die mit der Standard-OP-1-Vorrichtung behandelt worden waren. In Kürze waren die experimentellen Beobachtungen wie folgt: die radiographisch beobachteten Knochenneubildung und Heilmuster bei Defekten, die mit rhOP-1 ohne Matrix behandelten wurden, waren ähnlich den Heilmustern, die vorstehend mit der herkömmlichen, Kollagen enthaltenden OP-1-Vorrichtung beobachtet wurden. Im Allgemeinen war die Knochenneubildung schon zwei Wochen nach der Operation offensichtlich. Der neue Knochen fuhr bis zur Tötung zwölf Wochen nach der Operation fort, sich zu verdichten, zu konsolidieren und sich umzugestalten. Diese Untersuchung zeigte, dass eine funktionelle Knochenvereinigung mit menschlichen OP-1-Vorrichtungen ohne Matrix möglich ist. Außerdem waren das Erscheinungsbild und die Charakteristika der Histologie nach zwölf Wochen ähnlich dem, wie sie mit der herkömmlichen, Kollagen enthaltenden Matrix OP-1-Vorrichtung beobachtet wurden. Von den sechs Defekten, die mit einer matrixfreien OP-1-Vorrichtung behandelt worden waren, hatten vier zwölf Wochen nach der Operation solide knöchige Verbindungen. Die restlichen beiden Defekte in demselben Tier zeigten radiographisch etwas frühe Knochenneubildung, waren jedoch bei der Tötung unvollständig über-

brückt oder gefüllt mit neuem Knochen. Die mittlere Torsionslast bis zum Versagen des geheilten Defekts war 40,05 N (Dies stellt das Äquivalent von etwa 79% von zuvor getesteten segmentalen Defekten dar, die mit der herkömmlichen, Kollagen enthaltenden OP-1-Vorrichtung behandelt worden waren und 61% von zuvor getesteter intakter Kontroll-Ulna).

[0065] Radiographisch wurde bei allen drei Formulierungen zwei Wochen nach der Operation eine extensive Knochenneubildung beobachtet. Zwischen zwei bis 12 Wochen erhöhte der neue Knochen sein Volumen und seine Radiodichtigkeit und füllte und überbrückte die Defekte. 12 Wochen nach der Operation (Tötung) hatte der radiodichte neue Knochen die Defekte, die mit rhOP-1-Formulierungen behandelt worden waren, signifikant gefüllt und überbrückt. Alle rhOP-1-Defekte waren bei der Tötung nach 12 Wochen mechanisch stabil und mit neuem Knochen überbrückt. Bei dem radiographischen Erscheinungsbild wurden zwischen den drei Formulierungen keine signifikanten Unterschiede gefunden, obwohl die Formulierungen 1 und 2 zu allen Zeitpunkten leicht besser wirkten als Formulierung 3.

[0066] Histologisch war proliferierender neuer Knochen innerhalb und in der Umgebung der Defekte vorhanden, die mit rhOP-1 behandelt worden waren. Die Überbrückung der Defekte und knochige Heilung waren im Wesentlichen 12 Wochen nach der Operation vollständig mit Lücken von Fibroknorpel zwischen Flächen von neuem signifikanten Knochenwachstum. Anzeichen für frühe Cortexentwicklung mit Verdichtung der Ränder von neuem Knochen waren bei allen rhOP-1-Defekten vorhanden. Es gab keine Unterschiede in der Bewertung der histologischen Reihenfolge, basierend auf der Art der Formulierung, obwohl Formulierung 2 bei der Qualität der Verbindung besser abschnitt als die Formulierungen 3 und 1.

[0067] Die mittlere Belastung bis zum Versagen der Defekte der Formulierung 1 war 47,64 N (94% der Defekte, die mit der Standard-OP-1-Vorrichtung behandelt worden waren und 73% der zuvor getesteten intakten Kontrollen). Die mittlere Belastung bis zum Versagen der Defekte der Formulierung 2 war 51,96 N (102% der Defekte, die mit der Standard-OP-1-Vorrichtung behandelt worden waren und 80% der zuvor getesteten intakten Kontrollen). Die mittlere Belastung bis zum Versagen der Defekte der Formulierung 3 war 50,86 N (100% der Defekte, die mit der Standard-OP-1-Vorrichtung behandelt worden waren und 78% der zuvor getesteten intakten Kontrollen). Es wurden keine signifikanten Unterschiede bei den mechanischen Testergebnissen zwischen den Formulierungsarten festgestellt. Defekte der Formulierung 2 waren bei der maximalen Last beim Versagen etwas besser als Formulierungen 3 und 1.

Tabelle 4.

Mechanische Testergebnisse für Defekte mit kritischer und unkritischer Größe, die mit rhOP-1 behandelt wurden, gegenüber nicht behandelten Kontrollen. Mittel \pm SD (Probengröße)			
Defektgröße (Behandlung)	Maximale Belastung (N)	Drehmoment (Nm)	% intakte Ulna
2,5 cm	46,11 \pm	2,77 \pm	70,64 \pm
(rhOP-1)	17,42(10)	1,05(10)	26,69(10)
2,5 cm	*	*	*
(Kontrolle)			
5,0 mm	51,81	3,11 \pm	79,37 \pm
(rhOP-1)	17,94	1,08(6)	27,48(6)
5,4 mm	9,20 \pm	0,55 \pm	14,09 \pm
(Kontrolle)	6,62(5)	0,40(5)	10,14(5)
3,0 mm	64,10 \pm	3,85 \pm	98,21 \pm
(rhOP-1)	49,12(4)	2,95(4)	75,25(4)
3,0 mm	21,91 \pm	1,31 \pm	33,57 \pm
(Kontrolle)	26,46(3)	1,59(3)	40,54(3)
1,5 mm	62,17 \pm	3,73 \pm	95,25 \pm
(rhOP-1)	30,48(4)	1,83(4)	46,70(4)
1,5 mm	19,43 \pm	1,17 \pm	29,76 \pm
(Kontrolle)	19,11(4)	1,15(4)	29,28(4)

*Wegen Instabilität Defekte nicht getestet

[0068] Es wurden auch Formulierungen getestet, die 20 mM Acetatpuffer, pH 4,5 und 5% Mannitol verwendeten. Untersuchungen unter Verwendung von unkritischen Defekten (5 mm Lücken) zeigten eine klare Verbesserung bei der Heilungsrate, wenn OP-1 anwesend war, im Vergleich mit Kontrollen. Spezifisch zeigten die Kontrollen im Durchschnitt nach 8 Wochen 14% der Stärke von intakten Ulnae, während mit OP-1 behandelte Defekte im Durchschnitt 79% zeigten. Radiographisch war schon zwei Wochen nach der Operation neuer Knochen offensichtlich und begann nach acht Wochen signifikant die Defekte zu füllen und zu überbrücken, die mit rhOP-1-Formulierungen behandelt worden waren. Keiner der sechs unbehandelten Kontrolldefekte war am Ende des Untersuchungszeitraums komplett geheilt. Einer der drei Defekte mit Formulierung 1 (Acetatpuffer) und drei der drei Defekte, die mit Formulierung 2 (PBS) behandelt worden waren, waren nach 8 Wochen vollständig mit neuem Knochen gefüllt und überbrückt. Alle sechs Defekte, die OP-1 erhielten, hatten Knochenneubildung und waren mechanisch stabil. Defekte mit Formulierung 2 waren signifikant besser bei den Resultaten der radiographischen Bewertung, bei der bis zum Versagen absorbierten Energie und bei der histologischen Qualität der Verbindung als mit Formulierung 1 behandelte Defekte. Andererseits wurden zwischen den beiden Formulierungen keine Unterschiede bei der mittleren Belastung beim Versagen, der Winkeldeformation und der histologischen Gesamterscheinung gefunden. Beide Formulierungen waren bei allen Kategorien signifikant besser als Kontrolldefekte. Histologisch war proliferierender neuer Knochen innerhalb und in der Umgebung der Defekte vorhanden, die mit rhOP-1 behandelt worden waren. Die Überbrückung der Defekte und knöchige Heilung waren 8 Wochen nach der Operation fast vollständig mit Lücken von Fibroknorpel zwischen Flächen von signifikantem neuem Knochenwachstum. Anzeichen für frühe Cortexentwicklung und Knochenremodellierung waren bei einigen der rhOP-1-Defekte vorhanden. Alle unbehandelten Kontrollen führten zu unvollständigen Vereinigungen, obwohl potentiell eine längerfristige Heilung durch eine gewisse Knochenneubildung an den Wirtsknochenenden und endostealen Regionen angezeigt wurde. Die mittlere Belastung bis zum Versagen der Defekte der Formulierung 2 war 53,23 N (104,5% der Defekte mit kritischer Größe, die mit der Standard-OP-1-Vorrichtung behandelt worden waren und 81,6% der zuvor getesteten intakten Kontrollen). Der Vergleich von Defekten unkritischer Größe, die mit 0,35 mg OP-1 behandelt worden waren, mit zuvor getesteten Defekten kritischer Größe, die mit 1,5 mg OP-1 ohne Trägermaterial behandelt worden waren (injizierbare Formulierungen) zeigten keinen signifikanten Unterschied bei der mittleren Beladung beim Versagen.

C. Heilung von Bruchdefekten unter Verwendung von matrixfreien knochenbildenden Vorrichtungen

1. Bruchuntersuchung am Kaninchen

[0069] Die Untersuchung eines Reparaturmodells von Brüchen bei Kaninchen (Mittelschaftbruch der Ulna) zeigt auch die Wirksamkeit der Verfahren und Vorrichtungen der Erfindung. Diese Untersuchung verglich die Wirkung der Verabreichung von matrixfreien OP-1-Vorrichtungen in drei Konfigurationen: 1) Acetatpuffer pH 4,5 (lösliches OP-1), 2) PBS (Suspension von OP-1) und 3) Pluronic-Gel. Vier Kaninchen wurden in jeder Gruppe unmittelbar nach der Bildung des Bruchs behandelt; contralaterale Kontrollen waren Gliedmaßen ohne Defekt. Die Tiere wurden 3 Wochen nach der Behandlung getötet. Zusammenfassend zeigten Tiere, denen die Acetat oder Pluronic enthaltenden OP-1-Vorrichtungen injiziert worden waren, einen signifikant größeren Bruchkallus bei radiographischer, Tast- und histologischer Untersuchung. Die mittlere Torsionsbelastung bis zum Versagen für alle Ulnae, die mit OP-1 behandelt worden waren, war $8,89 \pm 2,99$ N (Mittelwert \pm Standardabweichung) (8 Proben). Während die mittlere Torsionsbelastung bis zum Versagen für unbehandelte Kontroll-Ulna $7,9 \pm 2,92$ N war (9 Proben).

1a. Beschreibung des Testmaterials

[0070] Matrixfreie OP-1-Vorrichtungen in Lösung wurden verwendet. Die drei bewerteten Lösungskonfigurationen waren: (1) rhOP, zugemischt einer phosphatgepufferten Salzlösung, 8,71 mg OP-1/ml. Die Vorrichtungen wurden in einzelne Röhrchen verpackt. Der geschätzte Bereich des verabreichten Vorrichtungsvolumens war zwischen 30 μ l und 110 μ l pro Stelle; (2) rhOP, zugemischt 20 mM Acetatpuffer, pH 4,5, 0,99 mg OP-1/ml. Die Vorrichtungen wurden in einzelne Röhrchen verpackt, die 130 μ l enthielten. Die Vorrichtung wurde in eine Spritze gezogen. In allen Fällen wurden weniger als 100 μ l an jeder Stelle verabreicht. Der geschätzte Bereich von verabreichtem Implantatvolumen war zwischen 60 μ l und 90 μ l pro Stelle; und (3) rhOP in Pluronic-Gel, 0,87 mg OP-1/ml. Die Vorrichtung wurde in eine Spritze gepackt. Die Vorrichtung wurde bis zur Verabreichung an der defekten Stelle gekühlt aufbewahrt (verstrichene Zeit weniger als eine Minute). Jedes Dicke Gel wurde in allen Fällen unter Verwendung einer Nadel mit großer Kalibrierung (18) verabreicht.

[0071] In allen Fällen wurden die Dosierungen kalibriert, um etwa 100 μ g rhOP-1 an jeder Bruchstelle zu verabreichen.

[0072] Insgesamt wurden zwölf erwachsene männliche White New Zealand-Kaninchen, die zu diesem Zweck gezüchtet worden waren und die beim Beginn der Untersuchungen mindestens 9 Monate alt waren, verwendet. Alle Tiere waren vom Skelett her reif und wogen zwischen 2,4 und 3,0 kg und wurden von Lieferanten mit USDA-Lizenz bereitgestellt. Die Tiere wurden während einer Quarantäneperiode untersucht, um akute oder chronische medizinische Zustände auszuschließen und wurden radiographisch untersucht, um sich einer geeigneten Größe, Reife des Skeletts zu versichern und das keine offensichtlichen Anormalitäten im Knochenbau existierten. Spezielle Aufmerksamkeit wurde darauf gerichtet, Tiere von einheitlichem Geschlecht, einheitlicher Größe und einheitlichem Gewicht auszuwählen, um Abweichungen bei der Stärke der geheilten Brüche zu beschränken. Experimentelle traverse Brüche wurden unter Verwendung chirurgischer Standardverfahren bilateral in der zentralen Ulna von jedem Tier geschaffen. Die linke Ulna diente bei jedem Tier als unbehandelte Kontrolle. In Kürze wurden unter Verwendung von aseptischen Standardverfahren bilaterale Brüche induziert, indem laterale Schnitte von etwa 2,0 cm Länge gemacht wurden und die Freilegung der rechten Ulna wurde durch scharfe und stumpfe Sektion erreicht. Eine transverse Osteotomie wurde in der Mitte der Ulna unter Verwendung einer elektrischen chirurgischen Säge erzeugt. Die Stelle wurde dann mit resorbierbarem Faden geschlossen. Eine matrixfreie OP-1-Vorrichtung in Lösung wurde dann durch die weichen Gewebe in die Bruchstelle injiziert. Das Verfahren wurde dann auf der linken Seite wiederholt mit der Ausnahme, dass diese Bruchstellen nicht mit einer OP-1-Vorrichtung versehen wurden.

[0073] Den Tieren wurden intramuskulär vier Tage lang nach der Chirurgie Antibiotika verabreicht. Die Tiere wurden nach der Operation in Erholungskäfigen gehalten, bis sie bei vollem Bewußtsein waren und ihr Gewicht trugen, wonach sie in Standardkäfige transferiert wurden und ihnen die uneingeschränkte Bewegung erlaubt wurde. Die Glieder wurden nicht ruhiggestellt.

[0074] Wöchentliche Radiogramme wurden aufgenommen, um das Fortschreiten der Heilung zu beobachten. Alle Tiere wurden drei Wochen nach der Operation getötet. Alle Ulnae wurden en bloc gewonnen und mechanisch durch Torsion getestet. Die Bruchheilung wurde weiterhin mittels Histologie auf die Qualität und Menge von Knochenneubildung und Heilung bewertet.

[0075] Eine Woche nach der Operation war bei allen Brüchen die frühe Knochenneubildung offensichtlich. Spuren von leicht radiodichtem Material waren entlang den periostealen Grenzen anwesend. Die Menge an Knochenneubildung war eine Woche nach der Operation bei den Brüchen mit matrixfreien OP-1-Vorrichtungen signifikant größer als bei den (unbehandelten) Brüchen. Zwei Wochen nach der Operation war bei allen Brüchen, die mit der matrixfreien OP-1-Vorrichtungen behandelt wurden, ein Fortschreiten der Knochenneubildung offensichtlich. Nach drei Wochen war der Knochenkallus groß und die Brüche waren in der Gegenwart von OP-1 im Wesentlichen oder vollständig geheilt. Auf der linken (unbehandelten) Stelle war die Bruchstelle nach drei Wochen jedoch noch offensichtlich und die Menge an gebildetem Kallus weniger.

[0076] Die mittlere Torsionslast bis zum Versagen für alle Ulnae, die mit einer OP-1 Vorrichtung behandelt worden waren, war $8,89 \pm 2,99$ N (8) (Mittelwert \pm Standardabweichung (Probengröße)). Die mittlere Torsionslast bis zum Versagen für unbehandelte Kontrollulna war $7,91 \pm 2,92$ N (9).

[0077] Ein größeres Volumen an neuem Knochen und eine vollständige Überbrückung der Bruchstelle wurden bei allen rechten (mit OP-1-Vorrichtung behandelten) Brüchen im Vergleich mit links beobachtet. Die Proliferation von Kallus wurde beobachtet, die sich in das weiche Gewebe der behandelten Brüche ausdehnte. Die linken (unbehandelten) Stellen zeigten einheitlich Proliferation von neuem Knochen an den periostealen und endostealen Grenzen und frühe Knorpelbildung am Bruch, zeigten aber nicht konsistent vollständige knöchige Überbrückung des Bruchs.

[0078] Konsistent mit den radiographischen Resultaten, wurde ein größeres Volumen von neuem Knochen bei den Stellen beobachtet, die mit OP-1-Vorrichtungen behandelt worden waren.

2. Bruchuntersuchung bei der Ziege

[0079] Noch ein anderes Tiermodell für die Bewertung der verbesserten Bruchreparatur unter Verwendung von matrixfreien OP-1-Vorrichtungen ist ein Ziegen-Modell (akuter Bruch des mittleren Schafts der Tibia). Die Untersuchung vergleicht 0,5 mg OP-1 in Acetatpuffer und 1 mg OP-1 in Acetatpuffer und 1 mg OP-1 präzipitiert in PBS, unmittelbar nach der Schaffung des Bruchs unter Verwendung von chirurgischen Standardverfahren injiziert. Die Tiere werden beobachtet und versorgt wie bei den vorstehend beschriebenen Hunde- und Kaninchenuntersuchungen und werden typischerweise 2, 4 und 6 Wochen nach der Behandlung getötet.

[0080] Es wird erwartet, dass durch den Einschluß von matrixfreien knochenbildenden Vorrichtungen bei diesen Tieren eine verbesserte Knochenreparatur resultiert, wie bei den Kaninchenuntersuchungen gezeigt.

D. Reparatur von osteochondralen Defekten unter Verwendung matrixfreier OP-1-Vorrichtungen (Referenzbeispiel)

1. Osteochondrale Defekte in Kaninchen

[0081] Die folgende Untersuchung zeigt, dass matrixfreie knochenbildende Vorrichtungen sowohl die Reparatur des artikulären Knorpel, der den Knochen überzieht, als auch die Reparatur des darunter liegenden Knochens verbessern kann. In dieser Untersuchung wurde ein osteochondrales Standarddefektmodell des Kaninchens verwendet, um die verschiedenen injizierbaren Formen von OP-1 bei der Heilung dieser Art von Defekt zu bewerten.

[0082] Matrixfreie Vorrichtungen, die OP-1 enthalten, wurden in zwei verschiedenen injizierbaren Bereitstellungsformulierungen und in einer gefriergetrockneten Formulierung hergestellt. Alle Proben enthielten 125 µg OP-1. Formulierung 1: 20 mM Acetatpuffer, pH 4,5, mit 5% Mannitol, Gesamtvolumen 50 µl; Formulierung 2: Suspension in phosphatgepufferter Salzlösung (PBS); und Formulierung 3: gefriergetrocknet in Teilmengen von einer Probe.

[0083] Insgesamt sechs erwachsene männliche Kaninchen wurden verwendet. Osteochondrale Defekte mit einer vollen Dicke von 4 mm im Durchmesser wurden bilateral im Sulcus der Kniescheibe von jedem Tier erzeugt, insgesamt 12 Defekte unter Verwendung von chirurgischen Standardverfahren. Der linke Defekt erhielt eine der drei OP-1-Formulierungen und die Defekte der rechten Seite dienten als unbehandelte Kontrolle. Alle Tiere wurden zwölf Wochen nach der Operation getötet und die distalen Schienbeine en bloc entnommen. Die Defektstellen wurden histologisch und durch Betasten bewertet, wie hier vorstehend beschrieben.

[0084] Bei allen Defekten außer einem Defekt der PBS-Gruppe zeigt die OP-1-Seite eine signifikante Heilung

mit Regenerierung von Knochen und Knorpel. Obwohl auch bei den meisten der Kontrolldefekte ohne OP-1 eine Heilung beobachtet werden kann, ist die Reparatur unterlegen; üblicherweise ist die Heilung des darunter liegenden Knochens unvollständig und es liegt eine signifikante Unterproduktion von Glycosaminoglycanen (GAG) im Knorpel vor (wie durch leichtes Anfärben mit Toluidin zu sehen ist).

2. Schafmodell

[0085] Reparatur von osteochondralen und chondralen Defekten kann auch in einem Standard-Ziegen- oder -Schafmodell bewertet werden. Zum Beispiel wird unter Verwendung von chirurgischen Standardverfahren jedes Schaf in einer Untersuchung an beiden Gelenken des vorderen Knies operiert und es werden zwei Defekte pro Gelenk geschaffen (einer auf dem medialen Kondylus und einer auf dem lateralen Kondylus). Eines der Gelenke hat einen chondralen Defekt mit standardisierter partieller Dicke (5 mm im Durchmesser) auf jedem Kondylus, während das andere Gelenk zwei ähnliche, aber tiefere chondralen Defekt mit voller Dicke hat (etwa 1–2 mm im subchondralen Knochen). Ein Gelenk des Tieres wird mit einer matrixfreien knochenbildenden Vorrichtung formuliert und das andere Gelenk wird als unbehandelte Kontrolle gelassen. Jede Gruppe hat eine Untergruppe, die früh nach 8 Wochen getötet wird und eine andere, die für eine Langzeitbewertung 6–7 Monate gehalten wird. Es wird erwartet, dass die matrixfreien Vorrichtungen, die jede der hier beschriebenen Formulierungen verwendet, die Geschwindigkeit und die Qualität der Reparatur sowohl des artikulären Knorpel als auch des darunter liegenden Knochens erhöhen, in Übereinstimmung mit den hier vorstehend beschriebenen Resultaten.

E. Heilung von segmentalen Defekten unkritischer Größe in Hunden unter Verwendung von matrixfreien knochenbildenden Vorrichtungen (Referenzbeispiel)

1. Experiment 2

[0086] Wie bereits in Experiment 1 beispielhaft dargestellt (vgl. Sektion V.A.1.) können injizierbare Formulierungen von rhOP-1 verwendet werden, um Defekte unkritischer Größe (d. h. 5 mm, 3 mm, 1,5 mm) zu heilen. Das folgende Experiment ist eine Erweiterung von Experiment 1 und konzentriert sich auf das Defektmodell von 3 mm. Wie nachstehend detaillierter beispielhaft dargestellt ist, zeigten Defekte unkritischer Größe (3 mm), die mit rhOP-1 behandelt wurden, eine verbesserte Heilung und extensivere Knochenneubildung. Wie nachstehend gezeigt, stellt ein Defekt von 3 mm ein konsistentes und reproduzierbares Modell für die Bewertung der Beschleunigung von Prozessen der Bruchreparatur dar.

[0087] Dieses Experiment bewertet die Heilung von Defekten unkritischer Größe, die mit zwei OP-1-Formulierungen behandelt werden, rhOP-1 in Acetat/Lactosepuffer (OP/Puffer) und rhOP-1 in einem Carboxymethylcellulose (CMC) (OP/CMC)-Gel etwa vier Wochen nach der Operation. Die nachstehend zusammengefassten Resultate zeigen, dass Defekte unkritischer Größe, die mit injizierbarem rhOP-1 in CMC-Lösung und in Acetatpufferlösung behandelt wurden, signifikant schneller heilten im Vergleich mit Kontrollen mit CMC und Pufferträger und unbehandelten Kontrollen. Radiographisch zeigten die Defekte in beiden Gruppen mit OP-1-Behandlung (OP/CMC und OP/Puffer) eine frühe radiodichte Knochenbildung und Knochenüberbrückung 4 Wochen nach der Operation. Die mit OP/CMC behandelten Defekte waren entlang der lateralen Ulna fast vollständig gefüllt und überspannt mit Knochen nicht einheitlicher Dichte und unter Einbau der Ränder des Wirtsknochens. Proliferativer neuer Knochen war bei den mit OP/Puffer behandelten Defekten vorhanden. Keiner der Kontrolldefekte mit Träger (CMC und Puffer allein) zeigte nach 4 Wochen Anzeichen von Knochendefektheilung. Das histologische Aussehen von mit OP/CMC und OP/Puffer behandelten Defekten war ähnlich. Bei den mit OP behandelten Defekten hatten sich an den Defekträndern und entlang der Knochenhaut der Ulna, die sich über die defekte Stelle erstreckte, signifikante Mengen an neuem Knochen gebildet. Die Überbrückung des Knochendefekts war nach dem Zeitabschnitt von 4 Wochen nahezu vollständig. Mineralisierender Knorpel und fibröses Gewebe waren bei den mit OP behandelten Defekten vorhanden. Im Gegensatz dazu waren die Defekte mit Trägerkontrolle mit fibrösem Gewebe gefüllt und davon umgeben und hatten minimale Mengen von Knochenneubildung an den Defekträndern. Durchschnittlich hatten die mit OP/CMC behandelten Defekte nach 4 Wochen eine Torsionsstärke, die 51% der Stärke von intakten Ulna war, im Vergleich zu 14% bei den CMC-Trägerkontrollen. Defekte, die mit der OP/Pufferlösung behandelt wurden, hatten eine mittlere Torsionsstärke, die 44% der Stärke von intakten Ulna, während die Defekte mit Pufferkontrolle nur 9% der Torsionsstärke von intakten Ulna erreichten. Die mit OP/CMC und OP/Puffer behandelten Gruppen hatten nach 4 Wochen (9%) und 8 Wochen (27%) höhere mechanische Stärken als die unbehandelten Kontrollen.

Experimenteller Aufbau

[0088] Die Testproben bestanden aus rekombinantem menschlichem knochenbildendem Protein-1 (rhOP-1) in einem injizierbaren Verabreichungs-Matrixsystem. Die beiden rhOP-1-Formulierungen und die beiden Kontrollen mit nur Träger wurden bewertet und mit zuvor getesteten und berichteten unbehandelten Kontrolldefekten verglichen. Nur über zwei dieser drei Formulierungen wird hier berichtet. Eine Formulierung (OP/CMC) bestand aus 0,35 mg rhOP-1 in 100 µl Carboxymethylcellulose(CMC)-Gel, und wurde in drei sterilen Spritzen bereitgestellt. Eine zweite Formulierung (OP/Puffer) bestand aus 0,35 mg rhOP-1 in 100 µl Acetatpuffer und wurde als OP-1-Lösung bereitgestellt. Die Kontrolle aus nur Träger bestand aus 100 µl CMC-Gel (CMC-Kontrolle), die in drei sterilen Spritzen bereitgestellt wurde und aus 100 µl Acetatpuffer (Pufferkontrolle), die als Kontrolllösung bereitgestellt wurde. Proben mit bekannten Mengen und Inhalt wurden von Creative BioMolecules, Inc. (Hopkinton, MA) hergestellt und geliefert.

[0089] Bilaterale segmentale Defekte der Ulna, 3,0 mm lang, wurden in allen Tieren geschaffen. Die rechten Defekte erhielten eine der beiden rhOP-1-Formulierungen, so dass drei Stellen von jeder Formulierung untersucht wurden. Die linken Defekte erhielten die Kontrolle mit nur Träger, die kein rhOP-1 enthielt. Es wurden wöchentliche Radiogramme aufgenommen, um den Fortschritt der Heilung zu untersuchen. Bei der Tötung wurden alle Ulnae en bloc gewonnen und wurden, wenn ausreichend geheilt, mechanisch durch Torsion getestet. Segmente wurden mittels Histologie auf Gewebeantwort, Qualität und Menge an Knochenneubildung und Ausmaß an Heilung bewertet. Erwachsene männliche Mischlingshunde, die für diesen Zweck gezüchtet worden waren, wurden wegen ihrer Verfügbarkeit, der leichten Behandlung, der anatomischen Größe und wegen der bekannten Charakteristika der Knochenreparatur und der Remodellierung bei dieser Untersuchung verwendet. Alle Tiere waren vom Skelett her reif, wogen zwischen 44 und 63 Pfund (im Mittel 54 lb) und wurden von Martin Creek Kennels, USDA Nummer 71-B-108 (Willowford, AK) geliefert. Es wurde insbesondere darauf Wert gelegt, Tiere von einheitlicher Größe und einheitlichem Gewicht auszusuchen, um Unterschiede in der Knochengeometrie und Belastung zu beschränken.

Chirurgie

[0090] Anästhesie wurde durch intravenöse Injektion von Natriumpentothal mit der Dosis von 5,0 mg/lb Körpergewicht verabreicht. Nach der Induktion wurde ein endotrachealer Tubus platziert und die Anästhesie mittels Inhalation von Isofluran aufrechterhalten. Beide Vorderläufe wurden auf sterile Weise vorbereitet und zurechtgelegt. Es wurde ein lateraler Schnitt von etwa 2 Zentimeter Länge vorgenommen und die Freilegung der Ulna wurde durch stumpfe und scharfe Sektion erreicht. Der Defekt von 3,0 mm wurde in der mittleren Ulna unter Verwendung einer Stichsäge erzeugt. Die Speiche wurde für mechanische Untersuchungen erhalten und es wurde keine interne oder externe Fixierung verwendet. Die Stelle wurde mit Salzlösung gespült, um Knochensplitter und ausgetretene Markzellen zu entfernen. Die weichen Gewebe wurden sorgfältig in Schichten um den Defekt geschlossen. Die geeignete Probenformulierung wurde dann entsprechend dem Behandlungsschema in die defekte Stelle injiziert. Die Prozedur wurde dann auf der contralateralen Seite mit der geeigneten Probe wiederholt.

Radiogramme

[0091] Es wurden wöchentlich Radiogramme der Vorderläufe bis vier Wochen nach der Operation erhalten. Es wurden Standardaufnahmezeiten und -intensitäten verwendet. Um die radiographischen Resultate zu quantifizieren wurde jedem Radiogramm ein numerischer Wert zugeteilt, der auf der in Tabelle 5 beschriebenen Bewertungsskala beruhte.

Tabelle 5

RADIOGRAPHISCHE BEWERTUNGSSKALA	
	Grad:
Keine Veränderung gegenüber Aussehen unmittelbar nach der Operation	0
Spur von radiodichtem Material im Defekt	1
Flockige Radiodichte mit Flecken neuer Verkalkung	2
Der Defekt ist zumindest an einem Punkt mit Material nicht einheitlicher Radiodichte überbrückt	3
Der Defekt ist auf der medialen und lateralen Seite des Defekts mit Material nicht einheitlicher Radiodichte überbrückt, die Schnittenden des Randes bleiben sichtbar	4
Wie Grad 3; mindestens einer von vier Rändern wird von neuem Knochen verdeckt	5
Der Defekt wird von einheitlichem neuem Knochen überbrückt; die Schnittenden des Randes sind nicht mehr sichtbar	6

Tötung

[0092] Die Tiere wurden unter Verwendung einer intravenösen Überdosis an Barbiturat getötet. Die Ulna und die Speiche wurden unmittelbar en bloc entnommen und in mit Salzlösung getränkten Windeln plaziert. Beide Ulnae wurden einer Makrophotographie unterzogen und Kontaktradiogramme aufgenommen. Weiche Gewebe wurden sorgfältig von der defekten Stelle weggeschnitten. Eine wassergekühlte Säge wurde verwendet, um die Ulna in Stücke einheitlicher Länge von 9 cm zu zersägen, wobei die defekte Stelle in der Mitte der Testprobe gelegen ist.

Mechanische Testung

[0093] Unmittelbar nach der Sektion, wenn die Heilung durch Befühlen mit der Hand ausreichend erschien, wurden Proben auf Versagen bei Verdrehung auf einer MTS hydraulischen Testmaschine mit geschlossenem Kreislauf (Minneapolis, MN) getestet, die unter Hubkontrolle bei einer konstanten Vorschubrate von 50 mm/Min. geführt wurde. Jedes Ende des Knochensegments war in eine zylindrische Aluminiummuffe montiert und mit Methylmethacrylat einzementiert. Ein Ende war starr fixiert und das andere wurde gegen den Uhrzeigersinn gedreht. Da die Ulna des Hundes eine leichte Krümmung hat, wurden die Proben exzentrisch montiert, um die Drehung der Proben coaxial mit der der Testvorrichtung zu halten. Die Torsionskraft wurde mittels eines Hebelarms von sechs cm eines servohydraulischen Materialtestsystems übertragen. Es wurden gleichzeitig Aufzeichnungen von der Verdrehung des Implantats vorgenommen, gemessen durch die Hubkontrolle der Maschine, während die Last von der Belastungszelle aufgezeichnet wurde. Die Daten wurden mittels eines Analog-Digital-Wandlers und eines PC und einer online Aufnahmesoftware aufgezeichnet. Es wurden Kurven der Kraft-Winkel-Verdrehung erzeugt, aus denen das Drehmoment und die Winkeldeformation bis zum Versagen erhalten wurden, und die Energieaufnahme bis zum Versagen als die Fläche unter der Last-Verdrehungskurve berechnet wurde.

Histologie

[0094] Getestete und nicht getestete Proben wurden für die histologische Bewertung vorbereitet. Die einzelnen Proben wurden unmittelbar nach der mechanischen Testung oder bei nicht getesteten Proben nach der Sektion durch Eintauchen in 10%-ige gepufferte Formalinlösung fixiert. Auf einer wassergekühlten Diamantensäge wurden die Proben durch Durchschneiden der Proben entlang ihrer langen Achse geteilt. Dieses Verfahren resultierte in zwei Portionen von jeder Probe für verschiedene histologische Präparationen, einschließlich nicht entkalkter Grundschnitte und nicht entkalkter Mikrotomschnitte.

[0095] Nach der Fixierung wurden die Proben, die für die nicht entkalkten Schnitte vorgesehen waren, in gradierten Ethylalkohollösungen von 70% bis 100% hydriert. Die Proben wurden dann in Methylmethacrylatmonomer plaziert und die Polymerisation zugelassen. Die Grundschnitte wurden durch Schneiden der Proben auf einer wassergekühlten Mark V CS600-A (East Grandy, CT) Sektionssäge hoher Geschwindigkeit in Schnitte von etwa 700 bis 1.000 Micron Dicke erhalten. Diese Schnitte wurden auf einen Acrylobjektträger montiert und unter Verwendung einer metallurgischen Schleifscheibe auf 100 Micron Dicke abgeschliffen und Mikroradiogramme wurden unter Verwendung von Standardverfahren aufgenommen. Nach der Mikroradiographie wur-

den die Schnitte weiter auf etwa 50 Micron abgeschliffen und mit basischem Fuchsin und Toluidinblau für die histologische Bewertung angefärbt, die die Qualität der Verbindung, das Aussehen und die Qualität des Knochenrands und des gitterförmigen Knochens, die Anwesenheit von Knochenmarkselementen, die Remodellierung des Knochens und die entzündliche Reaktion bewertete (Tabelle 6).

TABELLE 6

HISTOLOGISCHE BEWERTUNGSSKALA

Qualität der Verbindung:		Grad:
	Keine Anzeichen einer fibrösen oder anderen Verbindung	0
	fibröse Verbindung	1
	osteocondrale Verbindung	2
	Knochenverbindung	3
	Knochenverbindung mit Reorganisation der Ränder	4
Randentwicklung:		
	im Defekt nicht vorhanden	0
	Verdichtung der Grenzen	1
	erkennbare Bildung	2
	intakte Ränder, aber nicht vollständig	3
	vollständige Bildung normaler Ränder	4
Entzündungsreaktion:		
	ernsthafte Reaktion	0
	ernsthafte/moderate Reaktion	1
	moderate Reaktion	2
	milde Reaktion	3
	keine Reaktion	4
GESAMTPUNKTE:		12

EXPERIMENTELLE ERGEBNISSE

Radiographische Bewertung

[0096] Eine Zusammenfassung der radiographischen Grade für jede Stelle wird in Tabelle 7 bereitgestellt. 4 Wochen nach der Operation hatten die Defekte, die mit OP/CMC behandelt waren, einen mittleren radiographischen Grad von 3 von 6 möglichen Punkten. Mit OP/Puffer behandelte Defekte hatten einen mittleren radiographischen Grad von 4. Defekte, die mit der CMC-Trägerkontrolle und nur mit Puffer behandelt waren, hatten im Schnitt endgültige radiographische Grade von 1,33 und 1,0. Bei beiden Gruppen, die mit OP-1 behandelt waren, OP/CMC und OP/Puffer, gab es schon drei Wochen nach der Operation Anzeichen von radiodichter Knochenneubildung in den Defekten und entlang den lateralen Rändern des Defekts. Nach vier Wochen hatten sich in den Defekten und in dem umgebenden subkutanen Gewebe signifikante Mengen an neuem Knochen gebildet. Die OP/CMC-Defekte waren fast vollständig gefüllt und mit Knochen uneinheitlicher Dichte entlang der lateralen Grenze der Ulna überbrückt. Der neue Knochen wurde signifikant mit den defekten Rändern eingebaut. In zwei der drei mit OP/Puffer behandelten Defekte blieben die Ränder des Wirts sichtbar, obwohl proliferativer neuer Knochen anwesend war. Im Gegensatz dazu war vier Wochen nach der Operation keiner der OP/CMC- oder OP/Puffer-Defekte vollkommen überbrückt oder gefüllt. In der CMC-Kontrollgruppe überlagerte nach drei Wochen früher neuer Knochen die Knochenränder des Wirts und nahm weiterhin an Radiodichte zu. Erneut zeigten die Pufferkontrolldefekte nach vier Wochen im Gegensatz dazu an den Defekträndern nur ein leichtes Anwachsen der Radiodichte. Keiner der Kontrolldefekte in den Gruppen zeigte Anzeichen von knöchiger Defektheilung.

TABELLE 7

RESULTATE DER RADIOGRAPHISCHEN BEWERTUNG				
Art des Implantats	1 Woche	2 Wochen	3 Wochen	4 Wochen
OP/CMC	0	1	2	3
OP/CMC	0	0	1	3
OP/CMC	0	1	2	3
CMC-Kontrolle	0	0	1	1
CMC-Kontrolle	0	1	1	2
CMC-Kontrolle	0	0	0	1
OP/Puffer	0	1	2	3
OP/Puffer	0	1	2	4
OP/Puffer	0	1	2	5
Pufferkontrolle	0	0	0	1
Pufferkontrolle	0	0	0	1
Pufferkontrolle	0	0	1	1
OP/CMC	0,0 ± 0,0	0,67 ± 0,58	1,67 ± 0,58	3,0 ± 0,0
Mittelwert ± St.-Abw. (n)	(3)	(3)	(3)	(3)
CMC-Kontrolle	0,0 ± 0,0	0,33 ± 0,58	0,67 ± 0,58	1,33 ± 0,58
Mittelwert ± St.-Abw. (n)	(3)	(3)	(3)	(3)
OP-Puffer	0,0 ± 0,0	1,0 ± 0,0	2,0 ± 0,0	4,0 ± 1,0
Mittelwert ± St.-Abw. (n)	(3)	(3)	(3)	(3)
Pufferkontrolle	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,33 ± 0,58	1,0 ± 0,0
Mittelwert ± St.-Abw. (n)	(3)	(3)	(3)	(3)
OP/CMC = 0,35 mg rhOP-1 in 100 µl CMC-Gel CMC-Kontrolle = 100 µl CMC-Trägergel allein OP/Puffer = 0,35 mg rhOP-1 in 100 µl Acetatpufferlösung Pufferkontrolle = 100 µl Acetatpufferträgerlösung allein OP/CMC – 4 Wochen				

[0097] Eine Woche nach der Operation gab es bei keinem der OP/CMC-Defekte Veränderungen beim radiographischen Aussehen. Nach 2 Wochen waren Spuren von radiodichten Gebieten an den abgeschnittenen Knochenenden vorhanden. Nach 3 Wochen war ein Anwachsen von Radiodichte von neuem Knochen zu beobachten, der sich in den Defekten und entlang den lateralen Defekträndern bildete. Ein Defekt zeigte Anzeichen von früher knöchiger Überbrückung. Nach 4 Wochen hatten die OP/CMC-Defekte eine signifikante Menge an radiodichtem neuem Knochen in dem Defekt. Die Defekte waren entlang der lateralen Grenze der Ulna fast vollständig mit Knochen nicht einheitlicher Dichte gefüllt und überbrückt. Neuer Knochen wurde signifikant mit den Defekträndern eingebaut. Keiner der mit OP/CMC behandelten Defekte war 4 Wochen nach der Operation vollständig mit neuem Knochen gefüllt oder solide davon überbrückt. Der letztliche radiographische Grad für jeden Defekt war 3 von 6 möglichen Punkten (Mittelwert $3,0 \pm 0,0$, $n = 3$).

CMC-Kontrolle – 4 Wochen

[0098] Zwei Wochen nach der Operation gab es keine signifikanten Veränderungen beim radiographischen Aussehen der CMC-Kontrolldefekte. Nach 3 Wochen begannen bei 2 von 3 Defekten die Ränder des Wirts mit neuem Knochen überlagert zu werden. Nach 4 Wochen zeigten die CMC-Defekte ein gewisses Anzeichen der Aktivität für neuen Knochen an den Defekträndern, aber kein Anzeichen von knöchiger Defektheilung. Die letztlichen radiographischen Grade waren 1, 2 und 1 von 6 möglichen Punkten (Mittelwert $1,33 \pm 0,58$, $n = 3$).

OP/Puffer – 4 Wochen

[0099] Eine Woche nach der Operation gab es bei keinem der mit OP/Puffer behandelten Defekte Verände-

rungen beim radiographischen Aussehen. Zwei Wochen nach der Operation waren Spuren von radiodichten Gebieten in den OP/Puffer-Defekten und entlang den Defektgrenzen anwesend. Eine signifikante Knochenneubildung wurde auch in den subkutanen Geweben um die Defekte gesehen. Nach 3 Wochen erschienen Flocken an neuem Knochen in den Defekten und in den darüberliegenden weichen Geweben bildete sich neuer Knochen. Nach 4 Wochen gab es ein signifikantes Anwachsen bei der Bildung von radiodichtem neuen Knochen, der die mit OP-1 behandelten Defekte füllte und überbrückte. In zwei von drei Defekten blieben die Ränder sichtbar, obwohl proliferativer neuer Knochen die Defekte füllte und überbrückte. Keiner der mit OP/Puffer behandelten Defekte war zum Zeitpunkt der Tötung nach 4 Wochen vollständig gefüllt mit neuem Knochen oder davon solide überbrückt. Die letztlichen radiographischen Grade waren 3, 4 und 5 von 6 möglichen Punkten (Mittelwert $4,0 \pm 1,0$, $n = 3$).

Pufferkontrolle – 4 Wochen

[0100] 3 Wochen nach der Operation gab es bei keinem der nur mit der Pufferkontrolle behandelten Defekte signifikante Veränderungen beim radiographischen Aussehen. Nach 4 Wochen wurde eine Erhöhung bei der Radiodichte an den Rändern beobachtet, obwohl keine Anzeichen der Defektheilung evident waren. Der letzte radiographische Grad für jede Stelle war 1 von 6 möglichen Punkten (Mittelwert $1,0 \pm 0,0$, $n = 3$).

Grobe Beobachtungen

[0101] OP-1-Defekte: Alle mit OP/CMC und OP/Puffer behandelten Defekte waren manuell stabil und hatten sichtbar eine Masse von Knochenneubildung an der Defektstelle.

[0102] Trägerkontrolldefekte: Keiner der CMC- und nur Pufferkontrolldefekte war nach 4 Wochen manuell stabil, obwohl alle mechanisch getestet wurden.

Mechanische Testung

[0103] Eine Zusammenfassung der mechanischen Testresultate erscheint in Tabelle 8

OP/CMC

[0104] 4 Wochen nach der Operation war die mittlere Belastung bis zum Versagen von Defekten von 3 mm, die mit OP/CMC behandelt waren, $33,08 \pm 16,41$ N ($n = 3$). Dies bedeutet 51% der Kraft von intakten Kontrollen, die zuvor getestet wurden. Die mittlere Winkeldeformation war $31,13 \pm 15,32$ Grad. Die mittlere Energie, die bis zum Versagen aufgenommen wurde, war $41,64 \pm 30,52$ Nm-Grad.

CMC-Kontrolle

[0105] 4 Wochen nach der Operation war die mittlere Belastung bis zum Versagen von Defekten von 3 mm, die mit CMC-Kontrolle behandelt waren, $9,32 \pm 16,41$ N ($n = 3$). Dies bedeutete 14% der Kraft von intakten Kontrollen, die zuvor getestet wurden. Die mittlere Winkeldeformation war $33,36 \pm 25,95$ Grad. Die mittlere Energie, die bis zum Versagen aufgenommen wurde, war $10,53 \pm 8,62$ Nm-Grad.

OP/Puffer

[0106] 4 Wochen nach der Operation war die mittlere Belastung bis zum Versagen von Defekten von 3 mm, die mit OP/Puffer behandelt waren, $29,03 \pm 16,79$ N ($n = 3$). Dies bedeutet 44% der Kraft von intakten Kontrollen, die zuvor getestet wurden. Die mittlere Winkeldeformation war $36,14 \pm 14,71$ Grad. Die mittlere Energie, die bis zum Versagen aufgenommen wurde, war $37,87 \pm 27,73$ Nm-Grad.

Pufferkontrolle

[0107] 4 Wochen nach der Operation war die mittlere Belastung bis zum Versagen von Defekten von 3 mm, die mit Pufferkontrolle behandelt waren, $5,62 \pm 1,65$ N ($n = 3$). Dies bedeutet 9% der Kraft von intakten Kontrollen, die zuvor getestet wurden. Die mittlere Winkeldeformation war $24,91 \pm 12,03$ Grad. Die mittlere Energie, die bis zum Versagen aufgenommen wurde, war $3,94 \pm 4,12$ Nm-Grad.

TABELLE 8

MECHANISCHE TESTRESULTATE					
Implantat	Maximale Belastung bis zum Versagen (N)	Drehmoment (Nm)	Prozent intakte Kontrolle (%)	Winkelbildung	Bis zum Versagen absorbierte Energie (Nm-Grad)
OP/CMC	49,37	2,96	75,65	35,72	63,57
OP/CMC	16,56	0,99	25,37	14,04	6,78
OP/CMC	33,32	2,00	51,05	43,62	54,56
MITTELWERT \pm STANDARDABWEICHUNG	33,08 \pm 16,41	1,99 \pm 0,98	50,69 \pm 25,14	31,13 \pm 15,32	41,64 \pm 30,52
CMC-Kontrolle	12,81	0,77	19,63	33,26	14,06
CMC-Kontrolle	11,00	8,00	16,85	59,35	16,83
CMC-Kontrolle	4,14	0,25	6,34	7,46	0,70
MITTELWERT \pm STANDARDABWEICHUNG	9,32 \pm 4,57	3,01 \pm 4,33	14,27 \pm 7,01	33,36 \pm 25,95	10,53 \pm 8,62
OP/Puffer	32,47	1,95	49,75	50,11	55,91
OP/Puffer	43,83	2,63	67,15	37,53	51,77
OP/Puffer	10,79	0,65	16,53	20,78	5,94
MITTELWERT \pm STANDARDABWEICHUNG	20,03 \pm 16,79	1,74 \pm 1,01	44,48 \pm 25,72	36,14 \pm 14,71	37,87 \pm 27,73
Pufferkontrolle	4,82	0,29	7,38	11,12	0,73
Pufferkontrolle	4,53	0,27	6,94	30,32	2,50
Pufferkontrolle	7,52	0,45	11,52	33,29	8,59
MITTELWERT \pm STANDARDABWEICHUNG	5,62 \pm 1,65	0,34 \pm 0,10	8,62 \pm 2,53	24,91 \pm 12,03	3,94 \pm 4,12

Histologie

[0108] Eine Zusammenfassung der Resultate der histologischen Bewertung ist in Tabelle 9 dargestellt. Von 12 Gesamtpunkten war der mittlere histologische Grad der Defekte, die mit OP/CMC behandelt waren, $7,00 \pm 0,87$. Der mittlere histologische Grad der CMC-Kontrolldefekte war $4,50 \pm 0,87$. Die mittleren histologischen Grade der OP/Pufferdefekte und der Pufferkontrollen waren $6,08 \pm 0,14$ und $4,0 \pm 1,0$.

OP/CMC

[0109] Die Behandlung resultierte nach vier Wochen in einer frühen osteochondralen Überbrückung mit Gebieten an mineralisierendem Knorpel. In mit OP/CMC behandelten Defekten wurde eine signifikante Knochenneubildung in den periostealen und endostealen Bereichen der Ulna beobachtet, die sich über die Grenzen des Defekts ausbreitete. Gebiete von mineralisierendem Knorpel und etwas fibröses Gewebe waren in den Defekten vorhanden. Die Überbrückung der Defekte war nach vier Wochen nicht erreicht. Die Ränder des Wirts blieben sichtbar, obwohl es Anzeichen des Einbaus von neuem Knochen und Remodellierung gab.

CMC-Kontrolle

[0110] Nach vier Wochen wurde in den CMC-Kontrolldefekten keine vollständige knöchige Heilung beobachtet. Die Kontrolldefekte resultierten in fibrösen Verbindungen mit keinen Anzeichen von knöchiger Überbrückung. Es wurde beobachtet, dass fibröses Gewebe und mineralisierender Knorpel die Defekte füllten und umgaben. Sehr kleine Mengen an neuem Knochen hatten sich entlang der Knochenhaut der Ulna und am der endostealen Region der Ulna in der Nähe der Ränder des Wirts gebildet. Es wurden Anzeichen an Resorption des Rands des Wirts an den Enden des Defekts beobachtet.

OP/Puffer

[0111] Behandelte Defekte wurden mit mineralisierendem Knorpel und fibrösem Gewebe gefüllt. In den endostealen und periostealen Regionen der Ulna in der Nähe der Grenzen des Defekts bildete sich neuer Knochen und frühe Zeichen von Überbrückung mit neuem Knochen waren evident, obwohl keiner der Defekte vollkommen überbrückt war. Die Knochenränder des Wirts zeigten Anzeichen von Einbau mit neuem Knochen, wurden aber nach vier Wochen nicht völlig überdeckt. Es wurde eine gewisse Remodellierung der Knochenränder des Wirts und eine frühe Verdichtung entlang der Grenzen des neuen Knochens beobachtet. Neuer Knochen bildete sich auch in den subkutanen Gewebeschichten, die die defekte Stelle überlagerten und sich über die Defektgrenzen erstreckten.

Pufferkontrolle

[0112] In keinem der Pufferkontrolldefekte wurde vier Wochen nach der Operation vollständige knöchige Heilung beobachtet. Nicht behandelte Defekte zeigten fibröse Verbindungen mit keinen Anzeichen von knöchiger Überbrückung; es wurde fibröses Gewebe beobachtet, das die Defekte füllte und sie umgab. Andere nicht behandelte Defekte zeigten kein Anzeichen einer fibrösen oder anderen Verbindung. Sehr wenig Knochenneubildung wurde bei den Pufferkontrolldefekten beobachtet. Endostealer neuer Knochen erstreckte sich aus der Markhöhle der Ulna und entlang den lateralen Defektgrenzen bildete sich periostealer neuer Knochen. Die Knochenenden des Wirts waren sichtbar mit Anzeichen von Randresorption.

TABELLE 9

RESULTATE DER HISTOLOGISCHEN BEWERTUNG				
	Qualität der Verbindung	Randentwicklung	Entzündungsreaktion	Gesamtbewertung
Implantat				
OP/CMC	1,5	1	4	6,5
OP/CMC	3	1	4	8
OP/CMC	1,5	1	4	6,5
MITTELWERT ± STANDARDABWEICHUNG	2,0 ± 0,87	1,0 ± 0,0	4,0 ± 0,0	7,0 ± 0,87
CMC-Kontrolle	1	0	4	5
CMC-Kontrolle	1	0	2,5	3,5
CMC-Kontrolle	1	0	4	5
MITTELWERT ± STANDARDABWEICHUNG	1,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	3,50 ± 0,87	4,50 ± 0,87
OP/Puffer	1,25	1	4	6,25
OP/Puffer	1	1	4	6
OP/Puffer	1	1	4	6
MITTELWERT ± STANDARDABWEICHUNG	1,08 ± 0,14	1,0 ± 0,0	4,0 ± 0,0	6,08 ± 0,14
Pufferkontrolle	1	0	2	3
Pufferkontrolle	1	0	4	5
Pufferkontrolle	0	0	4	4
MITTELWERT ± STANDARDABWEICHUNG	0,67 ± 0,58	0,0 ± 0,0	3,33 ± 1,15	4,0 ± 1,0

2. Experiment 3

[0113] Von rekombinantem menschlichem knochenbildendem Protein-1 (rhOP-1), wenn implantiert in Kombination mit Knochenkollagenmatrix, wurde gezeigt, dass es diaphyseale segmentale Defekte kritischer Größe in Tieren durch die Bildung von neuem Knochen heilt, der biologisch und biomechanisch funktionell ist. Der

Zweck dieser Untersuchung war die Bewertung der Wirksamkeit von matrixfreien injizierbaren Formulierungen von rhOP-1 für die Beschleunigung der Knochenheilung in einem Hundemodell für Defekte unkritischer Größe.

[0114] Bilaterale osteoperiosteale segmentale Defekte von 3,0 mm Länge wurden in der mittleren Ulna von 18 erwachsenen männlichen Mischlingshunden erzeugt. Die Speiche wurde ohne zusätzliche Fixierung wegen der mechanischen Stabilität erhalten. Weiche Gewebe wurden vor der Injektion von rhOP-1 geschlossen. Neun Tiere erhielten rhOP-1-Formulierungen in einen Defekt und die Trägerkontrollen in den contralateralen Defekt und sie wurden 4 Wochen nach der Operation getötet. Neun unbehandelte Kontrolldefekte wurden in Zeiträumen von 4, 8 und 12 Wochen für den Vergleich mit der rhOP-1-Behandlung bewertet. In regelmäßigen Abständen wurden Radiogramme aufgenommen, um das Fortschreiten der Heilung zu untersuchen. Bei der Tötung wurden alle Ulnae durch Torsion mechanisch getestet, ob die Heilung ausreichend war. Nicht entkalkte histologische Schnitte wurden für die Qualität und Menge an Knochenneubildung und das Ausmaß an Heilung bewertet.

[0115] Radiographisch war die Knochenneubildung schon zwei Wochen nach der Operation in mit rhOP-1 behandelten Defekten evident und nach 4 Wochen überbrückte neuer Knochen den Defekt. Im Gegensatz dazu zeigten Stellen mit Trägerkontrollen 4 Wochen nach der Operation wenig oder keine Knochenbildung. Darüber hinaus waren die Torsionsstärken von mit rhOP-1 behandelten Defekten nach 4 Wochen signifikant größer als mit Träger behandelte oder unbehandelte Kontrollen. Weiterhin waren die Torsionsstärken von behandelten Defekten nach 4 Wochen praktisch gleich der Stärke von nicht behandelten Kontrollen nach 12 Wochen. Eine eindeutige Beschleunigung der Defektheilung und der Knochenbildung resultierte aus der Behandlung mit rhOP-1. Die histologischen Befunde korrelierten mit den radiographischen und mechanischen Testergebnissen.

[0116] Die Resultate dieser Untersuchung bestätigen, dass knochenbildende Proteine, die in Defekte unkritischer Größe injiziert werden, die Defektheilung beschleunigen können, einschließlich Kallusbildung am Bruch und Bildung von überbrückendem Knochen. Defekte, die mit rhOP-1 behandelt wurden, bildeten neuen Knochen signifikant schneller und stellten die Stärke und Steifheit des Bruchs früher wieder her als unbehandelte Kontrollen.

[0117] Zusammenfassend hat die Fähigkeit der hier vorstehend beschriebenen matrixfreien Vorrichtungen, die Defektreparatur zu verbessern, einschließlich der Beschleunigung der Rate und der Verbesserung der Qualität von neu gebildetem Knochen, Auswirkungen für die Verbesserung der Knochenheilung bei betroffenen Individuen wie Diabetikern, Rauchern, fettleibigen Individuen, alten Individuen, von Osteoporose betroffenen Individuen, Benutzern von Steroiden und anderen, die wegen eines erworbenen oder angeborenen Zustands eine reduzierte Fähigkeit haben, Knochenbrüche zu heilen, einschließlich Individuen mit gestörtem Blutfluß zu ihren Extremitäten. Solche Individuen erleben eine gestörte Heilung, was von einer reduzierten Fähigkeit resultiert, Vorläuferzellen zu fördern, und erleben Nekrose und/oder Sepsis.

[0118] Die hier offenbarten Verfahren und Formulierungen stellen durch beschleunigte Knochenbildung eine verbesserte Knochenbildung bereit. Spezifisch kann bei Befolgung der hier offenbarten Verfahren und Protokolle die Rate der Knochenbildung, einschließlich Bildung von Knochenkallus und Überbrückung, beschleunigt werden. Wie hier beispielhaft dargestellt, erfolgt die Brückenbildung schneller und in einem kürzeren Zeitrahmen, was die stabilere Knochenbildung zuläßt, und dabei die biomechanische Stärke von sich neu bildendem Knochen verbessert.

[0119] Es ist auf dem Fachgebiet bekannt, dass die Kallusbildung eine Stufe in dem vielstufigen Heilungsprozess ist, der in der Knochenbildung kulminiert. Spezifisch umfasst der Heilungsprozess fünf Stufen: Ereignis, Entzündung, Bildung von weichem Kallus, Bildung von hartem Kallus und Remodellierung. Das Ereignis beginnt mit der Einleitung des Bruchs und geht weiter, bis die Energie völlig verteilt ist. Das Entzündungsstadium ist durch Hämatombildung an der Bruchstelle charakterisiert, Knochennekrose an den Enden der Fragmente und einem Entzündungsinfiltrat. Granulationsgewebe ersetzt nach und nach das Hämatom, Fibroblasten produzieren Kollagen und Osteoclasten beginnen, nekrotischen Knochen zu entfernen. Das Abflauen von Schmerz und Schwellung markiert den Beginn der dritten Stufe des weichen Kallus. Diese Stufe ist durch eine erhöhte Vaskularisierung und reichliche Bildung von neuem Knorpel charakterisiert. Das Ende der Stufe des weichen Kallus geht einher mit der Verbindung der Fragmente durch fibröses oder Knorpelgewebe. Während der vierten Stufe oder der des harten Kallus wandelt sich der Kallus in Geflechtknochen um und erscheint klinisch geheilt. Die letzte Stufe des Heilungsprozesses umfasst die langsame Remodellierung von Geflecht- zu Lamellenknochen und die Rekonstruktion des medullaren Kanals (vgl. "Current Diagnosis & Treatment in Orthopedics," Hrsg. H. B. Skinner (LANGE Medical Book Publ.)).

F. Reparatur von chondralen Defekten mit matrixfreien knochenbildenden Vorrichtungen (Schaf)

1. Experiment 1

[0120] Unter Verwendung von ähnlichen Verfahren und Materialien wie vorstehend beschrieben (vgl. die entsprechenden Teile von D.2) wurde die folgende Untersuchung durchgeführt, um weiter hin zu zeigen, dass das beispielhafte knochenbildende Protein OP-1, wenn es in einer matrixfreien Vorrichtungen verabreicht wird, die aktive Knorpelbildung und die Reparatur von chondralen Defekten in gewichttragenden Gelenken induzieren kann.

[0121] Wie bereits vorstehend beschrieben ist ein Defekt eine strukturelle Zerstörung des Knorpels und kann die Konfiguration eines Hohlraums annehmen, eines dreidimensionalen Defekts, wie zum Beispiel einer Lücke, einer Höhle, eines Lochs oder einer anderen substantiellen Zerstörung der strukturellen Integrität. Defekte im artikulären Knorpel können sich durch die gesamte Tiefe des artikulären Knorpel erstrecken und/oder in den Knochen unter dem Knorpel (osteocondrale Defekte) oder die Defekte können oberflächlich sein und beschränkt auf das Knorpelgewebe selbst (chondrale oder subchondrale Defekte).

[0122] Am Anfang erfährt beschädigte Knorpelmatrix einen Abbau durch Metalloproteinasen, die durch zelluläre Bestandteile in der Nähe freigesetzt werden. Der proteolytische Abbau befreit von beschädigten Matrixkomponenten und setzt dabei anabolische Cytokine frei, die in der Matrix eingeschlossen sind. Wie es gegenwärtig verstanden wird, stimulieren von der Matrix freigesetzte Cytokine die Proliferation von Chondrocyten und, was wichtig ist, die Synthese einer neuen makromolekularen Matrix. Die Anwesenheit von Zusammenlagerungen von proliferierenden Chondrocyten, wie mikroskopisch bestimmt, ist einer der ersten Indikatoren der Reparaturantwort des Knorpels. Vermutlich wirkt diese Reparatur der katabolischen Wirkung der Proteasen entgegen und stabilisiert das Gewebe durch erhöhte Matrixsynthese.

[0123] Der artikuläre Knorpel und die Reparatur des artikulären Knorpel sind durch Standardverfahren der Histologie und Histochemie leicht zu untersuchen. Diese Verfahren sind im Fachgebiet bekannt und umfassen mikroskopische Untersuchungen von Schnitten von Knorpel, die durch eines einer Zahl von histochemischen Färbemitteln gefärbt sind, einschließlich, aber nicht beschränkt auf, Toluidinblau, Hämatoxylin und Eosin, von Kossa, Safranin O und Masson's Trichromfarbe. Nach der Anwendung von verschiedenen Farbstoffen kann der Durchschnittsfachmann die Reparaturantwort des Knorpels durch die Identifikation von proliferierenden Chondrocyten und die Bestimmung der Qualität und Menge an Matrix wie Kollagen und Proteoglycanen bewerten, die von den Chondrocyten synthetisiert werden.

[0124] Wie hier verwendet, betrifft artikulärer Knorpel spezifisch Hyalin-Knorpel, ein nicht vaskuläres, nicht mineralisiertes Gewebe, welches die artikulierenden Oberflächen der Teile von Knochen in Gelenken bedeckt. Unter physiologischen Bedingungen liegt artikulärer Knorpel über stark vaskulärem mineralisiertem Knochen, der als subchondraler Knochen bezeichnet wird. Artikulärer Knorpel ist durch spezialisierte knorpelbildende Zellen charakterisiert, Chondrocyten genannt, die eingebettet sind in eine extrazelluläre Matrix, die Fasern von Kollagen (vorwiegend Typ II Kollagen, ebenso wie die seltenen Typen wie die Typen IX und XI) umfasst, verschiedene Proteoglycane, einschließlich Glycosaminoglycane, andere Proteine und Wasser.

[0125] In dieser Untersuchung wurden Schafe als ein Modell zur Bewertung der Reparatur von chondralen Defekten von 1–2 mm Gesamttiefe \times 7 mm Gesamtdurchmesser auf der gewichttragenden kondylären Oberfläche des Knies verwendet. Die Defekte waren chondrale Defekte partieller Tiefe und umfassten nicht den subchondralen Knochen, was durch das Fehlen einer Blutung nach der Schaffung des Defekts evident war. Eine weitere Bestätigung wurde durch die Histologie von dünnen Schnitten zum Zeitpunkt der Tötung erhalten; die Defekte erstreckten sich nicht in den subchondralen Knochen.

[0126] Das experimentelle Protokoll wird in Tabelle 10 bereitgestellt. Unter Verwendung von standardisierten Chirurgieverfahren wurde ein Defekt 2 mm Gesamttiefe \times 7 mm Gesamtdurchmesser auf der gewichttragenden kondylären Oberfläche des rechten und linken Knies chirurgisch gemacht. Das rechte Knie diente als Kontrollknie. Eine flüssige matrixfreie OP-1-Vorrichtung (50 oder 250 μ g OP-1) in 20 mM Natriumacetat, pH 4,5, wurde entweder als ein einziger Bolus mittels Injektion in das intraartikuläre Gelenk verabreicht oder intermittierend mittels einer lokal implantierten subkutanen Minipumpe (ALZET® 2002, ALZA Scientific Products, Palo Alto, CA) verabreicht (0,5 μ l pro Stunde für 2 Wochen Dauer; insgesamt 200 μ l). Zahlreiche geeignete Minipumpen sind leicht verfügbar und werden vom Durchschnittsfachmann routinemäßig für die Verabreichung von pharmazeutischen und/oder therapeutischen Mitteln verwendet; der Durchschnittsfachmann wird die bevorzugte Art und Rate der Verabreichung unter den Umständen einschätzen können. Die Heilung der chondralen

Defekte wurde mit histologischen und histochemischen Standardverfahren bewertet.

Tabelle 10

Reparatur von chondralem Defekt beim Schaf		
Gruppe	Linkes Knie (matrixfreie Vorrichtung)	Rechtes Knie (Kontr.)
I	50 µg OP-1	Kein Rx
II	250 µg OP-1	Kein Rx
III	50 µg OP-1 mittels Minipumpe	Träger mittels Minipumpe
IV	250 µg OP-1 mittels Minipumpe	Träger mittels Minipumpe

[0127] Die bisher gesammelten Daten einer 3-monatigen Untersuchung mit Minipumpe (Gruppe III und IV) offenbaren, dass matrixfreie OP-1-Vorrichtungen die Knorpelbildung und die anschließende Reparatur von chondralen Defekten induzieren können. Nach zwölf Wochen wurde bei den Kontrolldefekten nur wenig Hinweise für die chondrale Defektreparatur beobachtet. Mittels der histologischen und histochemischen Standardbewertung wurde jedoch in dem mit matrixfreiem OP-1 behandelten Tier sowohl die Bildung von neuem Knorpel als auch die Fusion von altem und neuem Knorpel beobachtet. Unter Verwendung von im Stand der Technik anerkannten histologischen und histochemischen Indizes als Maß für die chondrale Reparatur, stimulierte OP-1 das Einwachsen von synovialen Zellen in das defekte Gebiet. Diese Zellen differenzierten zu Proteoglycan-reichen artikulären Chondrocyten voller Dicke und davon resultierte die Reparatur des chondralen Defekts.

[0128] Die Heilung eines Knorpeldefekts partieller Dicke ohne Beteiligung von subchondralem Knochen in einem erwachsenen Tier ist ohne Präzedenzfall und zeigt, dass die aktive Knorpelbildung eine Eigenschaft des Reparaturprozesses ist, der von einer matrixfreien knochenbildenden Vorrichtung induziert wird. Aus diesen Untersuchungen wird geschlossen, dass eine matrixfreie knochenbildende Vorrichtung verwendet werden kann, um chondrale Defekte in vivo zu reparieren. Es ist insbesondere wichtig, dass eine solche Reparatur an einem gewichttragenden Gelenk in einem großen Tiermodell wie dem Schaf vorkommen kann.

[0129] Andere Untersuchungen der Reparatur von chondralen Defekten unter Verwendung von matrixfreien OP-1-Vorrichtungen (zum Beispiel die Experimente, die vorstehend in Gruppe I und II dargestellt sind) sind gegenwärtig noch in der Durchführung. Es werden ähnliche Ergebnisse erwartet wie die, die mit dem vorstehend beschriebenen experimentellen Beispiel der Verabreichung mit einer Minipumpe erhalten wurden, das heißt, es wird erwartet, dass ein einziger Bolus von injizierbarer matrixfreier Vorrichtung in das intraartikuläre Gelenk einen chondralen Defekt in gewichttragenden Gelenken repariert.

G. Alternative Verfahren zur Heilung von segmentalen Defekten unkritischer Größe unter Verwendung von matrixfreien knochenbildenden Vorrichtungen (Referenzbeispiel)

1. Experiment 1: Die Wirkungen der verzögerten Verabreichung von matrixfreier knochenbildender Vorrichtung auf die Reparatur von Defekten unkritischer Größe (Hunde)

[0130] Der Zweck dieser Untersuchung war die Beurteilung der Heilung von Defekten unkritischer Größe, die zu verschiedenen verzögerten Verabreichungszeiten nach der Verletzung mit matrixfreien OP-1-Vorrichtungen behandelt wurden. Die nachstehend beispielhaft dargestellte besondere Vorrichtung ist eine injizierbare Formulierung der matrixfreien knochenbildenden Vorrichtung. Es wird erwartet, dass andere Ausführungsformen der Vorrichtung ähnliche Resultate ergeben.

[0131] In Kürze sind die experimentellen Beobachtungen wie folgt: im Allgemeinen heilten segmentale Defekte unkritischer Größe, die mit matrixfreien OP-1-Vorrichtungen behandelt wurden, 4 Wochen nach der Verletzung in signifikant höherem Maß im Vergleich mit Kontrollen mit injizierbarem Träger. Von besondere Signifikanz sind die unerwarteten Resultate, die anzeigen, dass mindestens ein Indiz für die Defektheilung, speziell die erhöhte mechanische Stärke der Ulna, durch die Manipulation der Zeit nach der Verletzung, zu der die matrixfreien OP-1-Vorrichtungen verabreicht werden, erhöht werden kann.

[0132] Zum Zwecke dieses Experiments und wie hier verwendet, bedeutet Verletzung das zufällige Auftreten eines Defekts (wie ein unerwarteter physischer Unfall, der im Auftreten von Defekten unkritischer Größe resultiert), das beabsichtigte Auftreten eines Defekts (wie die chirurgische Manipulation, die im Auftreten von De-

fekten unkritischer Größe resultiert), oder nicht traumatisch induzierte Defekte, die von einer oder von mehreren der folgenden Krankheiten oder Störungen verursacht sein können: Sauerstoffmangel; Ischämie; primäre und metastatische Tumorbildung; infektiöse Krankheiten; entzündliche Krankheiten; sogenannte Kollagenkrankungen (einschließlich Defekten der Kollagensynthese, des Kollagenabbaus oder bei normaler Matrix); angeborene, genetische oder Entwicklungskrankheiten; Ernährungskrankheiten; metabolische Krankheiten; idiopathische Krankheiten; und Krankheiten in Zusammenhang mit abnormer mineralischer Homöostase, um nur einige zu nennen.

[0133] Einige der hier beispielhaft dargestellten Verfahren beinhalten den Schritt der Verabreichung einer matrixfreien Vorrichtung an einer defekten Stelle nach dem Beginn des Heilungsprozesses; die Stufen des Heilungsprozesses und die damit verbundenen physiologischen Ereignisse wurden früher beschrieben. Ein anderes der Verfahren umfasst den Schritt der Verabreichung einer matrixfreien Vorrichtung an einer defekten Stelle während der Reifung der endogenen Matrix an der Stelle; die Ereignisse, die mit der endogenen Matrixbildung während der endochondralen Knochenbildung einhergehen, wurden auch früher beschrieben. In einer gegenwärtig bevorzugten Ausführungsform stellt die vorliegende Erfindung die Verwendung einer matrixfreien Vorrichtung für die Herstellung eines Medikaments für die Reparatur eines Knochendefekts, eines chondralen Defekts oder eines osteochondralen Defekts bereit, die den Schritt der Verabreichung einer matrixfreien Vorrichtung zu Zeiten nach der Verletzung umfassen, die verzögert sind. Solche Verzögerungen können kurzfristig sein, mittel- oder langfristig, wie nachstehend beschrieben. Das Ausmaß, um das die Verabreichung verzögert ist, hängt von den Umständen ab und der Durchschnittsfachmann wird leicht die Bedeutung davon verstehen.

[0134] Wie nachstehend gezeigt ist die verbesserte Heilung und Defektreparatur das Ergebnis der Verabreichung einer matrixfreien Vorrichtung an einer defekten Stelle nach Ablauf von bestimmten Zeiträumen nach der Verletzung. Zum Beispiel kann die verzögerte Verabreichung Zeiten von mindestens 0,5 Stunden bis zu mindestens 6 Stunden nach der Verletzung umfassen; in einer anderen Ausführungsform können die verzögerten Verabreichungszeiten Zeiten von mindestens 6 Stunden bis zu 24 Stunden umfassen, oder von mindestens 24 Stunden bis zu 48 Stunden nach der Verletzung. In einer gegenwärtig bevorzugten Ausführungsform ist die Verzögerung mindestens 6 Stunden. Andere Verabreichungszeiten nach der Verletzung werden durch die vorliegende Erfindung ebenfalls in Betracht gezogen. In gewissen anderen gegenwärtig bevorzugten Ausführungsformen können die verzögerten Verabreichungszeiten von mindestens 48 Stunden bis zu mindestens 72 Stunden nach der Verletzung betragen. In noch anderen Ausführungsformen können die Verabreichungszeiten signifikant über 72 Stunden hinausreichen, d. h. knochenbildende Vorrichtungen könne an der defekten Stelle erst in der Stufe der Remodellierung der Knochenheilung verabreicht werden. Es werden auch Verfahren in Betracht gezogen, bei denen matrixfreie knochenbildende Vorrichtungen an der Stelle eines Defekts unkritischer Größe zu vielen Zeitpunkten nach der Verletzung verabreicht werden. Zum Beispiel ist eine gegenwärtig bevorzugte Vielzahl von 0,5 bis 6 Stunden und 7 Tage nach der Verletzung. Eine Vielzahl von verzögerten Verabreichungen kann mittels manueller Verabreichung an die defekte Stelle oder mittels automatischer Verabreichungen unter Verwendung einer früher beschriebenen Minipumpe erreicht werden.

Experimenteller Aufbau

[0135] Insgesamt 12 erwachsene Mischlingshunde wurden verwendet. Wie früher beschrieben wurden bilaterale segmentale Defekte der Ulna von 3 mm Länge in allen Tieren erzeugt. Wie in dieser besonderen Untersuchung beispielhaft dargestellt war die verwendete matrixfreie Formulierung von OP-1 3,5 mg OP-1/ml, die in 100 Mikroliter Lactose/Acetatpuffer verabreicht wurde, wie vorstehend beschrieben. Zwölf Tieren wurden in den rechten Defekt matrixfreie Vorrichtungen zu verschiedenen Zeitpunkten nach der Verletzung verabreicht und Kontrollvorrichtungen wurden in den linken Defekt zu verschiedenen Zeitpunkten nach der Verletzung verabreicht. Drei Tiere wurden bei der Schaffung des Defekts behandelt (0 Stunden), drei 6 Stunden nach der Verletzung und drei 48 Stunden nach der Verletzung. Alle Tiere wurden 4 Wochen nach der Chirurgie getötet. Es wurden wöchentlich Radiogramme aufgenommen, um den Fortschritt der Heilung zu untersuchen. Bei der Tötung wurden Knochensegmente mittels Histologie auf Gewebereaktion, Qualität und Menge an Knochenneubildung und Ausmaß an Heilung beurteilt. Alle Ulnae wurden en bloc gewonnen und in Torsion mechanisch getestet.

[0136] Wie früher beschrieben wurden die Ulnae direkt nach der Sektion durch Torsion auf Versagen in einer MTS hydraulischen Testmaschine mit geschlossenem Kreislauf unter Hubkontrolle bei einer konstanten Vorschubrate von 50 mm/Min. getestet. Ein Ende war starr fixiert und das andere wurde gegen den Uhrzeigersinn gedreht. Die Torsionskraft wurde mittels eines Hebelarms von sechs cm eines servohydraulischen Materialtestsystems übertragen. Es wurden gleichzeitig Aufzeichnungen von der Verdrehung des Implantats vorgenommen, gemessen durch die Hubkontrolle der Maschine, während die Last von der Belastungszelle aufge-

zeichnet wurde. Die Daten wurden mittels eines Analog-Digital-Wandlers und eines PC und einer online Computeraufnahmesoftware aufgezeichnet. Es wurden Kurven der Kraft-Winkel-Verdrehung erzeugt, aus denen das Drehmoment und die Winkeldeformation bis zum Versagen erhalten wurden und die Energieaufnahme bis zum Versagen als die Fläche unter der Last-Verdrehungskurve berechnet wurde.

Resultate

[0137] Alle Proben wurden 4 Wochen nach der Chirurgie mechanisch getestet. Mechanisch hatten die Defekte, die die matrixfreie OP-1-Vorrichtung 6 Stunden nach der Verletzung erhielten, die höchste Torsionskraft; 73% von intakten Ulnae verglichen mit 64% nach 48 Stunden und 60% zur Stunde 0. Die Kontrolldefekte bei 0 Stunden, 6 Stunden und 48 Stunden nach der Verletzung hatten Kräfte von 23%, 28% und 24%.

[0138] Diese Untersuchung zeigt das überraschende Resultat, dass eine verbesserte Heilung eines Defekts unkritischer Größe durch eine verzögerte Verabreichung einer matrixfreien knochenbildenden Vorrichtung an der defekten Stelle nach der Verletzung erreicht werden kann. Dieses unerwartete Resultat steht in Beziehung zum Stadium der Knochenheilung oder der endogenen Matrixbildung an der defekten Stelle, einschließlich, aber nicht beschränkt auf, Ereignissen wie Klümpchenbildung, Infiltration von Vorläuferzellen und Kallusbildung, insbesondere weicher Kallus, um nur einige zu nennen. Darüber hinaus wird erwartet, dass andere Defektreparaturprozesse unter Einschluß des Knochens, wie die Reparatur von osteochondralen Defekten ähnlich denen, wie sie hier beschrieben wurden, durch eine verzögerte Verabreichung von matrixfreien knochenbildenden Vorrichtungen an der defekten Stelle nach der Verletzung verbessert werden können.

H. Weitere Untersuchungen der Reparatur von chondralen Defekten unter Verwendung von matrixfreien knochenbildenden Vorrichtungen (Schaf) (Referenzbeispiel)

1. Experiment 1: Glycosaminoglycane und andere Polymere als Träger für knochenbildendes Protein

[0139] Wie früher beschrieben sind gewisse bevorzugte Kategorien von Verbindungen als Träger in den hier betrachteten matrixfreien Vorrichtungen geeignet. Unter den gegenwärtig bevorzugten Kategorien sind Verbindungen, die im Fachgebiet als Gleitmittel anerkannt sind, speziell diejenigen, die natürlicherweise vorkommen und natürlicherweise physiologische Funktionen wie der Schutz und die Schmierung von Zellen und die Erhaltung der Integrität von Gewebe erfüllen, um nur einige zu nennen. Solche Verbindungen sind im Allgemeinen auch Befeuchtungsmittel und die Feuchtigkeit haltende Mittel. Eine Subkategorie von gegenwärtig bevorzugten Gleitmitteln umfasst die Biopolymere, die als Glycosaminoglycane bekannt sind. Glycosaminoglycane, die bei der vorliegenden Erfindung in Betracht kommen, umfassen, sind aber nicht beschränkt auf, Hyaluronsäure, Chondroitin, Dermatan und Keratan, um nur einige zu nennen. Es können sowohl sulfonierte als nicht sulfonierte Formen in der vorliegenden Erfindung verwendet werden. Andere Glycosaminoglycane sind für die Formulierung von matrixfreien Vorrichtungen geeignet, und der Durchschnittsfachmann wird andere geeignete Verbindungen entweder wissen oder in der Lage sein, sich ihrer unter Verwendung von lediglich Routineexperimenten zu versichern. Für eine detaillierte Beschreibung von Glycosaminoglycanen vgl. Aspinall, Polysaccharides, Pergamon Press, Oxford (1970).

[0140] Ein insbesondere bevorzugtes Glycosaminoglycan ist Hyaluronsäure (HA). HA ist ein natürlicherweise vorkommendes anionisches Polysaccharid oder komplexer Zucker. Sie wird in Knorpel und synovialer Flüssigkeit gefunden. HA ist im kosmetischen Grad und im medizinischen Grad erhältlich; zur Verwendung bei der vorliegenden Erfindung ist der medizinische Grad im Allgemeinen bevorzugt. HA kann beim Molekulargewicht von niedrig bis hoch reichen. In gewissen Ausführungsformen der vorliegenden Erfindung ist Material mit hohem Molekulargewicht vorzuziehen; nur als Beispiel kann HA 190 ($1,9 \times 10^6$ Da; 1% wird gegenwärtig bevorzugt, es sind aber Konzentrationen geeignet, die von 0,5–2% reichen), der Salzlösung zugemischt wurde, zweimal wöchentlich intraartikulär verabreicht werden (0,1 ml/kg), um chondrale Defekte zu reparieren. In anderen Ausführungsformen kann HA mit niedrigem Molekulargewicht (wie HA80, $0,8 \times 10^6$ Da; 1% wird bevorzugt, es sind aber Konzentrationen geeignet, die weniger als oder gleich 4% sind) verwendet werden. Unter Verwendung der hier bereitgestellten Lehren kann der Durchschnittsfachmann die Umstände beurteilen, unter denen die HA mit hohem Molekulargewicht dem Material mit niedrigem Molekulargewicht für die Defektreparatur vorzuziehen ist, und umgekehrt. Darüber hinaus wird dem Durchschnittsfachmann bewußt sein, dass HA in Lösung eine viskose Flüssigkeit ist, und dass die Viskosität durch Einstellung des Molekulargewichts und des Gehalts an HA manipuliert werden kann. Zum Beispiel ist es in einigen Ausführungsformen bevorzugt, sich der Viskosität der synovialen Flüssigkeit im Gelenk anzugleichen. Unter Verwendung von Fachwissen und Routineexperimenten, zusammen mit den hier bereitgestellten Lehren, kann der Durchschnittsfachmann matrixfreie knochenbildende Vorrichtungen für die Reparatur von chondralen Defekten formulieren, die HA als

Träger verwenden; die Viskosität der Vorrichtung ebenso wie der Proteingehalt können, wie durch die Umstände erforderlich und wie hier gelehrt, leicht angepaßt werden. HA ist kommerziell von mehreren Quellen erhältlich, einschließlich Sigma Chemical Company (St. Louis, MO), Genzyme Pharmaceuticals (Cambridge, MA) und Collaborative Laboratories (East Setauket, NY).

[0141] Glycosaminoglycan und andere polymere Träger wie Hyaluronsäure, die zur Verwendung mit den vorliegenden matrixfreien knochenbildenden Vorrichtungen geeignet sind, können in dem Schafmodell für chondrale Defekte beurteilt werden, das vorstehend beschrieben ist. Zum Beispiel werden mittels chirurgischer Standardverfahren in der gewichttragenden Oberfläche des medialen und lateralen Kondylus von beiden Kniegelenken in einem Schaf Defekte von 2 × 7 mm gemacht. Ein Kniegelenk wird durch intraartikuläre Verabreichung einer matrixfreien Vorrichtung mit OP-1/Hyaluronsäure behandelt und das andere Gelenk wird mit Hyaluronsäure allein behandelt.

[0142] Zwei Gruppen an Schafen werden untersucht: Gruppe I wird nach 8 Wochen getötet und Gruppe II wird nach 6 Monaten getötet. Wie früher beschrieben kann die Heilung von chondralen Defekten mittels Radiologie und histologischen und histochemischen Standardverfahren beurteilt werden. Von jedem Knie werden monatlich Radiogramme aufgenommen. Eine arthroskopische Untersuchung wird unter Verwendung von Standardverfahren und Standardausrüstung unter Anästhesie unmittelbar vor der Tötung vorgenommen. Unmittelbar nach der Tötung werden Proben des Kniegelenks in 10%-igem gepuffertem Formalin fixiert. Die Proben werden longitudinal geteilt und ein Teil in graduiertem Ethylalkohollösung von 70–100% entkalkt und in Methylmethacrylat eingebettet, geschnitten und für die histologische Beurteilung angefärbt.

[0143] Es wird erwartet, dass Hyaluronsäure enthaltende matrixfreie Vorrichtungen die Rate der Reparatur von chondralen Defekten erhöhen und das erreichte Maß an Reparatur verbessern. Die Reparatur kann in Tiermodellen durch Standardverfahren der Knorpelcharakterisierung beurteilt werden, einschließlich der histologischen Bewertung von gefärbten und fixierten Gewebeschnitten, der Lokalisierung von knorpelspezifischen Makromolekülen (wie Typ II Kollagen und Aggrecan), der Bestimmung des Profils an Proteoglycan und der mechanischen Testung. Alles Vorstehende kann durch einen Durchschnittsfachmann unter Verwendung von Routineexperimenten und dem Wissen auf dem Fachgebiet durchgeführt werden.

SEQUENZPROTOKOLL

(1) ALLGEMEINE INFORMATION

- (i) ERFINDER: DAVID C. RUEGER
MAJORIE M. TUCKER
- (ii) TITEL DER ERFINDUNG: MATRIXFREIE OSTEOGENE VORRICHTUNGEN,
IMPLANTATE UND VERFAHREN IHRER VERWENDUNG
- (iii) ANZAHL AN SEQUENZEN: 3
- (iv) KORRESPONDENZADRESSE:
 - (A) ADRESSAT: TESTA , HURWITZ & THIBEAULT
 - (B) STRASSE: 53 STATE STREET
 - (C) STADT: BOSTON
 - (D) STAAT: MASSACHUSETTS
 - (E) LAND: U.S.A.
 - (F) PLZ: 02109
- (v) COMPUTERLESBARE FORM:
 - (A) MEDIUMART: Floppy disk
 - (B) COMPUTER: IBM PC kompatibel
 - (C) BETRIEBSSYSTEM: PC-DOS/MS-DOS
 - (D) SOFTWARE: PatentIn Release #1.0, Version #1.25
- (vi) DATEN DER VORLIEGENDEN ANMELDUNG:
 - (A) ANMELDENUMMER: US
 - (B) ANMELDEDATUM:
 - (C) KLASSIFIKATION:
- (vii) DATEN DER FRÜHEREN ANMELDUNG:
 - (A) ANMELDENUMMER:
 - (B) ANMELDEDATUM:
- (viii) ANWALT-/AGENTENINFORMATION
 - (A) NAME: KELLEY, ROBIN D.
 - (B) REGISTRIERUNGSNUMMER: 34,637
 - (C) REFERENZ-/AKTENNUMMER: CRP-101
- (ix) TELEKOMMUNIKATIONSINFORMATION:
 - (A) TELEPHON: 617/248-7000
 - (B) TELEFAX: 617/248-7100

(2) INFORMATION FÜR SEQ ID NR:1:

- (i) SEQUENZCHARAKTERISTIKA:
 - (A) LÄNGE: 1822 Basenpaare
 - (B) TYP: Nucleinsäure
 - (C) STRANGART: Einzelstrang
 - (D) TOPOLOGIE: linear

- (ii) MOLEKÜLART: cDNA
- (iii) HYPOTHETISCH: NEIN
- (iv) ANTISENSE: NEIN
- (vi) ORIGINALQUELLE:
 - (A) ORGANISMUS: HOMO SAPIENS
 - (F) GEWEBEART: HIPPOCAMPUS
- (ix) EIGENSCHAFT:
 - (A) NAME/SCHLÜSSEL: CDS
 - (B) LAGE: 49..1341
 - (C) IDENTIFIKATIONVERFAHREN: experimentell
 - (D) ANDERE INFORMATION: /Funktion = "KNOCHENBILDENDES PROTEIN"
 - /Produkt = "OP1"
 - /Evidenz = EXPERIMENTELL
 - /Standard_Name = "OP1"
- (xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NR:1:

GGTGCGGGCC CGGAGCCCGG AGCCCGGGTA GCGCGTAGAG CCGGCGCG ATG CAC GTG	57
Met His Val	
1	
CGC TCA CTG CGA GCT GCG GCG CCG CAC AGC TTC GTG GCG CTC TGG GCA	105
Arg Ser Leu Arg Ala Ala Pro His Ser Phe Val Ala Leu Trp Ala	
5 10 15	
CCC CTG TTC CTG CTG CGC TCC GCC CTG GCC GAC TTC AGC CTG GAC AAC	153
Pro Leu Phe Leu Leu Arg Ser Ala Leu Ala Asp Phe Ser Leu Asp Asn	
20 25 30 35	
GAG GTG CAC TCG AGC TTC ATC CAC CGG CGC CTC CGC AGC CAG GAG CGG	201
Glu Val His Ser Ser Phe Ile His Arg Arg Leu Arg Ser Gln Glu Arg	
40 45 50	
CGG GAG ATG CAG CGC GAG ATC CTC TCC ATT TTG GGC TTG CCC CAC CGC	249
Arg Glu Met Gln Arg Glu Ile Leu Ser Ile Leu Gly Leu Pro His Arg	
55 60 65	
CCG CGC CCG CAC CTC CAG GGC AAG CAC AAC TCG GCA CCC ATG TTC ATG	297
Pro Arg Pro His Leu Gln Gly Lys His Asn Ser Ala Pro Met Phe Met	
70 75 80	
CTG GAC CTG TAC AAC GCC ATG GCG GTG GAG GAG GGC GGC GGG CCC GGC	345
Leu Asp Leu Tyr Asn Ala Met Ala Val Glu Glu Gly Gly Gly Pro Gly	
85 90 95	
GGC CAG GGC TTC TCC TAC CCC TAC AAG GCC GTC TTC AGT ACC CAG GGC	393
Gly Gln Gly Phe Ser Tyr Pro Tyr Lys Ala Val Phe Ser Thr Gln Gly	
100 105 110 115	
CCC CCT CTG GCC AGC CTG CAA GAT AGC CAT TTC CTC ACC GAC GCC GAC	441
Pro Pro Leu Ala Ser Leu Gln Asp Ser His Phe Leu Thr Asp Ala Asp	
120 125 130	
ATG GTC ATG AGC TTC GTC AAC CTC GTG GAA CAT GAC AAG GAA TTC TTC	489
Met Val Met Ser Phe Val Asn Leu Val Glu His Asp Lys Glu Phe Phe	
135 140 145	
CAC CCA CGC TAC CAC CAT CGA GAG TTC CGG TTT GAT CTT TCC AAG ATC	537
His Pro Arg Tyr His His Arg Glu Phe Arg Phe Asp Leu Ser Lys Ile	
150 155 160	
CCA GAA GGC GAA GCT GTC ACG GCA GCC GAA TTC CGG ATC TAC AAG GAC	585
Pro Glu Gly Glu Ala Val Thr Ala Ala Glu Phe Arg Ile Tyr Lys Asp	
165 170 175	
TAC ATC CGG GAA CGC TTC GAC AAT GAG ACG TTC CGG ATC AGC GTT TAT	633
Tyr Ile Arg Glu Arg Phe Asp Asn Glu Thr Phe Arg Ile Ser Val Tyr	
180 185 190 195	
CAG GTG CTC CAG GAG CAC TTG GGC AGG GAA TCG GAT CTC TTC CTG CTC	681
Gln Val Leu Gln Glu His Leu Gly Arg Glu Ser Asp Leu Phe Leu Leu	
200 205 210	
GAC AGC CGT ACC CTC TGG GCC TCG GAG GAG GGC TGG CTG GTG TTT GAC	729
Asp Ser Arg Thr Leu Trp Ala Ser Glu Glu Gly Trp Leu Val Phe Asp	

215	220	225	
ATC ACA GCC ACC AGC AAC CAC TGG GTG GTC AAT CCG CGG CAC AAC CTG Ile Thr Ala Thr Ser Asn His Trp Val Val Asn Pro Arg His Asn Leu 230 235 240			777
GGC CTG CAG CTC TCG GTG GAG ACG CTG GAT GGG CAG AGC ATC AAC CCC Gly Leu Gln Leu Ser Val Glu Thr Leu Asp Gly Gln Ser Ile Asn Pro 245 250 255			825
AAG TTG GCG GGC CTG ATT GGG CGG CAC GGG CCC CAG AAC AAG CAG CCC Lys Leu Ala Gly Leu Ile Gly Arg His Gly Pro Gln Asn Lys Gln Pro 260 265 270 275			873
TTC ATG GTG GCT TTC TTC AAG GCC ACG GAG GTC CAC TTC CGC AGC ATC Phe Met Val Ala Phe Phe Lys Ala Thr Glu Val His Phe Arg Ser Ile 280 285 290			921
CGG TCC ACG GGG AGC AAA CAG CGC AGC CAG AAC CGC TCC AAG ACG CCC Arg Ser Thr Gly Ser Lys Gln Arg Ser Gln Asn Arg Ser Lys Thr Pro 295 300 305			969
AAG AAC CAG GAA GCC CTG CGG ATG GCC AAC GTG GCA GAG AAC AGC AGC Lys Asn Gln Glu Ala Leu Arg Met Ala Asn Val Ala Glu Asn Ser Ser 310 315 320			1017
AGC GAC CAG AGG CAG GCC TGT AAG AAG CAC GAG CTG TAT GTC AGC TTC Ser Asp Gln Arg Gln Ala Cys Lys Lys His Glu Leu Tyr Val Ser Phe 325 330 335			1065
CGA GAC CTG GGC TGG CAG GAC TGG ATC ATC GCG CCT GAA GGC TAC GCC Arg Asp Leu Gly Trp Gln Asp Trp Ile Ile Ala Pro Glu Gly Tyr Ala 340 345 350 355			1113
GCC TAC TAC TGT GAG GGG GAG TGT GCC TTC CCT CTG AAC TCC TAC ATG Ala Tyr Tyr Cys Glu Gly Glu Cys Ala Phe Pro Leu Asn Ser Tyr Met 360 365 370			1161
AAC GCC ACC AAC CAC GCC ATC GTG CAG ACG CTG GTC CAC TTC ATC AAC Asn Ala Thr Asn His Ala Ile Val Gln Thr Leu Val His Phe Ile Asn 375 380 385			1209
CCG GAA ACG GTG CCC AAG CCC TGC TGT GCG CCC ACG CAG CTC AAT GCC Pro Glu Thr Val Pro Lys Pro Cys Cys Ala Pro Thr Gln Leu Asn Ala 390 395 400			1257
ATC TCC GTC CTC TAC TTC GAT GAC AGC TCC AAC GTC ATC CTG AAG AAA Ile Ser Val Leu Tyr Phe Asp Asp Ser Ser Asn Val Ile Leu Lys Lys 405 410 415			1305
TAC AGA AAC ATG GTG GTC CGG GCC TGT GGC TGC CAC TAGCTCCTCC Tyr Arg Asn Met Val Val Arg Ala Cys Gly Cys His 420 425 430			1351
GAGAATTCAG ACCCTTTGGG GCCAAGTTTT TCTGGATCCT CCATTGCTCG CTTGGCCAG			1411
GAACCAGCAG ACCAACTGCC TTTTGTGAGA CCTTCCCCTC CCTATCCCCA ACTTTAAAGG			1471
TGTGAGAGTA TTAGGAAACA TGAGCAGCAT ATGGCTTTTG ATCAGTTTTT CAGTGGCAGC			1531
ATCCAATGAA CAAGATCCTA CAAGCTGTGC AGGCAAAACC TAGCAGGAAA AAAAAACAAC			1591
GCATAAAGAA AATGGCCGG GCCAGGTCAT TGGCTGGGAA GTCTCAGCCA TGCACGGACT			1651
CGTTTCCAGA GGTAATTATG AGCGCCTACC AGCCAGGCCA CCCAGCCGTG GGAGGAAGGG			1711
GGCGTGGCAA GGGGTGGGCA CATTGGTGTC TGTGCGAAG GAAAATTGAC CCGGAAGTTC			1771

CTGTAATAAA TGTCACAATA AAACGAATGA ATGAAAAAAAA AAAAAAAAAA A

1822

(2) INFORMATION FÜR SEQ ID:NR:2

(i) SEQUENZCHARAKTERISTIKA:

- (A) LÄNGE: 431 Aminosäuren
- (B) TYP: Aminosäure
- (C) TOPOLOGIE: linear

(ii) MOLEKÜLTYP: Protein

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NR:2

Met His Val Arg Ser Leu Arg Ala Ala Ala Pro His Ser Phe Val Ala
 1 5 10 15
 Leu Trp Ala Pro Leu Phe Leu Leu Arg Ser Ala Leu Ala Asp Phe Ser
 20 25 30
 Leu Asp Asn Glu Val His Ser Ser Phe Ile His Arg Arg Leu Arg Ser
 35 40 45
 Gln Glu Arg Arg Glu Met Gln Arg Glu Ile Leu Ser Ile Leu Gly Leu
 50 55 60
 Pro His Arg Pro Arg Pro His Leu Gln Gly Lys His Asn Ser Ala Pro
 65 70 75 80
 Met Phe Met Leu Asp Leu Tyr Asn Ala Met Ala Val Glu Glu Gly Gly
 85 90 95
 Gly Pro Gly Gly Gln Gly Phe Ser Tyr Pro Tyr Lys Ala Val Phe Ser
 100 105 110
 Thr Gln Gly Pro Pro Leu Ala Ser Leu Gln Asp Ser His Phe Leu Thr
 115 120 125
 Asp Ala Asp Met Val Met Ser Phe Val Asn Leu Val Glu His Asp Lys
 130 135 140
 Glu Phe Phe His Pro Arg Tyr His His Arg Glu Phe Arg Phe Asp Leu
 145 150 155 160
 Ser Lys Ile Pro Glu Gly Glu Ala Val Thr Ala Ala Glu Phe Arg Ile
 165 170 175
 Tyr Lys Asp Tyr Ile Arg Glu Arg Phe Asp Asn Glu Thr Phe Arg Ile
 180 185 190
 Ser Val Tyr Gln Val Leu Gln Glu His Leu Gly Arg Glu Ser Asp Leu
 195 200 205
 Phe Leu Leu Asp Ser Arg Thr Leu Trp Ala Ser Glu Glu Gly Trp Leu
 210 215 220
 Val Phe Asp Ile Thr Ala Thr Ser Asn His Trp Val Val Asn Pro Arg
 225 230 235 240
 His Asn Leu Gly Leu Gln Leu Ser Val Glu Thr Leu Asp Gly Gln Ser
 245 250 255
 Ile Asn Pro Lys Leu Ala Gly Leu Ile Gly Arg His Gly Pro Gln Asn
 260 265 270
 Lys Gln Pro Phe Met Val Ala Phe Phe Lys Ala Thr Glu Val His Phe

275	280	285
Arg Ser Ile Arg Ser Thr Gly Ser Lys Gln Arg Ser Gln Asn Arg Ser		
290	295	300
Lys Thr Pro Lys Asn Gln Glu Ala Leu Arg Met Ala Asn Val Ala Glu		
305	310	315 320
Asn Ser Ser Ser Asp Gln Arg Gln Ala Cys Lys Lys His Glu Leu Tyr		
	325	330 335
Val Ser Phe Arg Asp Leu Gly Trp Gln Asp Trp Ile Ile Ala Pro Glu		
	340	345 350
Gly Tyr Ala Ala Tyr Tyr Cys Glu Gly Glu Cys Ala Phe Pro Leu Asn		
	355	360 365
Ser Tyr Met Asn Ala Thr Asn His Ala Ile Val Gln Thr Leu Val His		
	370	375 380
Phe Ile Asn Pro Glu Thr Val Pro Lys Pro Cys Cys Ala Pro Thr Gln		
	385	390 395 400
Leu Asn Ala Ile Ser Val Leu Tyr Phe Asp Asp Ser Ser Asn Val Ile		
	405	410 415
Leu Lys Lys Tyr Arg Asn Met Val Val Arg Ala Cys Gly Cys His		
	420	425 430

(2) INFORMATION FÜR SEQ ID NR:3:

(i) SEQUENZCHARAKTERISTIKA:

- (A) LÄNGE: 102 Aminosäuren
- (B) TYP: Aminosäure
- (C) TOPOLOGIE: linear

(ii) MOLEKÜLTYP: Protein

(ix) EIGENSCHAFT:

- (A) NAME/SCHLÜSSEL: Protein
- (B) LÄGE: 1..102
- (D) ANDERE INFORMATION: /Bezeichnung = OPX

/Bemerkung = "WOBEI JEDE XAA UNABHÄNGIG AUSGEWÄHLT IST
 AUS EINER GRUPPE VON EINER ODER MEHREREN
 SPEZIFIZIERTEN AMINOSÄUREN, WIE IN DER BESCHREIBUNG
 DEFINIERT"

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NR:3:

```

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

85      90      95
Xaa Ala Cys Gly Cys His
100

```

Patentansprüche

1. Verwendung einer matrixfreien Zusammensetzung, der eine Gerüststruktur fehlt, wobei die matrixfreie Zusammensetzung aus einem knochenbildenden Protein besteht, das in einer wässrigen Lösung dispergiert ist, für die Herstellung eines Arzneimittels zur Induzierung von endochondraler Knochenbildung in einem Säuger, die ausreicht, um einen Hohlraum definierenden Spalt in der Knochenstruktur aufzufüllen, wobei das knochenbildende Protein ausgewählt ist aus der Gruppe bestehend aus: OP1; OP2; OP3; BMP2; BMP3; BMP4; BMP5; BMP6; BMP9; BMP-10; BMP-11; BMP-12; BMP-15; BMP-3b; DPP, Vgl; Vgr; 60A-Protein; GDF-1; GDF-3; GDF-5; GDF-6; GDF-7; GDF-8; GDF-9; GDF-10; GDF-11, und wobei der Hohlraum ein Segmentdefekt von 0,5 cm bis 2,5 cm oder größer als 2,5 cm bis 4 cm ist.

2. Verwendung nach Anspruch 1, wobei das knochenbildende Protein ausgewählt ist aus der Gruppe bestehend aus: OP1; OP2; BMP2; BMP4; BMP5; BMP6.

3. Verwendung nach Anspruch 1, wobei das knochenbildende Protein OP1 ist.

4. Verwendung nach Anspruch 1, wobei das knochenbildende Protein das reife in einer Salzlösung solubilisierete OP1 ist.

Es folgt kein Blatt Zeichnungen