



(19)  
Bundesrepublik Deutschland  
Deutsches Patent- und Markenamt

(10) DE 696 29 294 T2 2004.04.29

(12)

## Übersetzung der europäischen Patentschrift

(97) EP 0 831 884 B1

(51) Int Cl.<sup>7</sup>: A61K 38/18

(21) Deutsches Aktenzeichen: 696 29 294.7

(86) PCT-Aktenzeichen: PCT/US96/07282

(96) Europäisches Aktenzeichen: 96 916 513.3

(87) PCT-Veröffentlichungs-Nr.: WO 96/039169

(86) PCT-Anmeldetag: 21.05.1996

(87) Veröffentlichungstag

der PCT-Anmeldung: 12.12.1996

(97) Erstveröffentlichung durch das EPA: 01.04.1998

(97) Veröffentlichungstag

der Patenterteilung beim EPA: 30.07.2003

(47) Veröffentlichungstag im Patentblatt: 29.04.2004

(30) Unionspriorität:

462497 05.06.1995 US

(84) Benannte Vertragsstaaten:

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

(73) Patentinhaber:

Genetics Institute, LLC, Cambridge, Mass., US;  
New York Society for the Relief of the Ruptured  
and Crippled Maintaining the Hospital for Special  
Surgery, New York, N.Y., US

(72) Erfinder:

WOZNEY, M., John, Hudson, US; WARREN, F.,  
Russel, Greenwich, US; RODEO, A., Scott, New  
York, US; HANNAFIN, A., Jo, Greenwich, US

(74) Vertreter:

Vossius & Partner, 81675 München

(54) Bezeichnung: VERWENDUNG VON KNOCHENMORPHOGENESEPROTEINEN ZUR HEILUNG UND REPARATUR  
VON BINDEGEWEBEFESTIGUNG

Anmerkung: Innerhalb von neun Monaten nach der Bekanntmachung des Hinweises auf die Erteilung des europäischen Patents kann jedermann beim Europäischen Patentamt gegen das erteilte europäische Patent Einspruch einlegen. Der Einspruch ist schriftlich einzureichen und zu begründen. Er gilt erst als eingeleitet, wenn die Einspruchsgebühr entrichtet worden ist (Art. 99 (1) Europäisches Patentübereinkommen).

Die Übersetzung ist gemäß Artikel II § 3 Abs. 1 IntPatÜG 1991 vom Patentinhaber eingereicht worden. Sie wurde vom Deutschen Patent- und Markenamt inhaltlich nicht geprüft.

## Beschreibung

[0001] Die vorliegende Erfindung betrifft das Gebiet der Gewebereparatur, vor allem die Regeneration einer funktionalen Bindung zwischen Bindegewebe, wie Sehnen, Knorpel oder Bänder, und Knochen. Diese funktionale Bindung kann durch Trauma oder Stress, oder durch degenerative oder angeborene Krankheiten zerstört werden. Folglich kann die vorliegende Erfindung in der Rekonstruktionschirurgie oder anderen Verfahren zur Regeneration einer funktionalen Bindung zwischen Bindegewebe und Knochen nützlich sein.

## HINTERGRUND DER ERFINDUNG

Hintergrund des Vorkommens und Ätiologie des Bedarfs:

[0002] Obwohl mehrere rekonstruktive chirurgische Verfahren auf der sicheren Heilung oder Bindung von Bindegewebe, insbesondere Sehnen oder Bänder, an Knochen basieren, ist wenig über den Heilungsprozess an der Verbindungsstelle Sehne-an-Knochen bekannt. Da die Stelle der Transplantatfixierung an den Knochen den schwächsten Bereich im frühen Zeitraum nach der Transplantation darstellt, besitzen Verfahren zur Verbesserung der frühen Transplantatfixierungsstärke eine bedeutende klinische Anwendung. Das ist von besonderer Wichtigkeit für Operationen an Knie, Schulter, Hüfte, Hand, Knöchel und Ellbogen.

[0003] Die Entwicklung der Einfügung von Sehnen oder Bändern in den Knochen ist schlecht verstanden. Die Einfügungsstelle wird durch Kollagenfasern vermittelt, bekannt als „Sharpey'sche Fasern“, die ununterbrochen Sehnen und Knochen verbinden. Es wird angenommen, dass sich Sharpey'sche Fasern im sich entwickelnden Skelett durch fortschreitende Mineralisierung der Bänder oder der Kollagenfasern der Knochenhaut durch Beschleunigung des Knochens während des Wachstums bilden. Untersuchungen haben gezeigt, dass Knochen an Sehnen durch Einwachsen des Knochens in das fibrovaskuläre Verbindungsgewebe, das sich anfänglich zwischen der Sehne und dem Knochen bildet, heilt. Es findet eine fortschreitende Mineralisierung des Verbindungsgewebes zusammen mit anschließendem Einwachsen des Knochens in die äußere Sehne statt. Trotz des Hinweises, dass der Knochen in das Kollagen-Gewebe einwächst, bleibt der Mechanismus eines solchen Einwachsens des Knochens und die Wirksamkeit und Stärke der Bindung unklar. Eine frühere Untersuchung der Heilung von Sehne-an-Knochen zeigte die Bildung einer Fasergewebeverbindungsstelle zwischen der Sehne und dem Knochen. Rodeo et al., Bone and Joint Surgery, 75-A: 1795-1803 (1993).

[0004] Entsprechend bleibt trotz beträchtlicher Anstrengungen im Gebiet ein Bedarf eines wirksamen

Verfahrens zur Reparatur einer funktionalen Verbindung zwischen Bindegewebe, wie Sehne oder Band, und Knochen.

## ZUSAMMENFASSUNG DER ERFINDUNG

[0005] Die vorliegende Erfindung stellt die Verwendung eines oder mehrerer Knochenmorphogenetischer Proteine (BMP) für die Herstellung eines Arzneimittels zur Regeneration einer funktionalen Bindung zwischen Bindegewebe oder Sehne und Knochen bereit, mit der Maßgabe, dass die BMPs nicht BMP-12, BMP-13 oder BMP-15 einschließen. Insbesondere ist die vorliegende Erfindung nützlich in Verfahren zur Behandlung von Patienten mit abgetrennten oder degenerierten Bindungen der Sehnen oder Bänder an Knochen. Einige Beispiele schließen Rekonstruktionschirurgie an Knie, Schulter, Hand, Knöchel oder Ellbogen ein. Spezielle Bereiche, in denen sich die vorliegende Erfindung als nützlich erweisen kann, schließen die Wiederherstellung des vorderen Kreuzbandes (ACL) oder des Handgelenkmuskels ein. Die gemäß der vorliegenden Erfindung hergestellten Zusammensetzungen sind darin vorteilhaft, dass sie knochenbildende Proteine verwenden, die durch rekombinante DNA-Technologie hergestellt werden können und daher möglicherweise in unbegrenzter Menge zur Verfügung stehen. Die gemäß der vorliegenden Erfindung hergestellten Zusammensetzungen sind weiter darin vorteilhaft, dass die Regeneration der Verbindungsstelle beschleunigt oder eine größere endgültige Stärke besitzen kann, und die zwischen Bindegewebe und Knochen gebildete Bindung kann nach Durchführung der Operation oder Reparatur schneller eine funktionale Stärke erreichen. Die gemäß der vorliegenden Erfindung hergestellten Zusammensetzungen sind weiter darin vorteilhaft, dass sie die Regeneration der funktionalen Bindung zwischen Bindegewebe und Knochen induzieren, während sie die Bildung von Faser- oder Granulationsgewebe an der Verbindungsstelle zwischen den Gewebetypen minimieren oder vermeiden.

[0006] Die gemäß der vorliegenden Erfindung hergestellten Zusammensetzungen sind insbesondere für die Fixierung einer runden Sehne in einem Knochen-Tunnel oder einer flachen Sehne auf einer Knochenoberfläche verwendbar. Mehrere klinische Beispiele sind wichtig. Ein allgemeines klinisches Beispiel ist die Wiederherstellung des vorderen Kreuzbandes (ACL). Die Wiederherstellung kann durch Verwendung des zentralen Drittels der Kniescheiben-Sehne mit einem gebundenen Knochenblock sowohl des Schienbeins als auch der Kniescheibe oder durch Verwendung der halbsehnigen oder dünnen Sehnen durchgeführt werden. Vorteile der Verwendung der Kniescheibensehne schließen die sofortige knochige Fixierung ein, die eine aggressive postoperative Rehabilitation und eine erhöhte Stärke erlaubt. Die Verwendung des zentralen Drittels der Knie-

scheibensehne war jedoch mit ungünstigen Folgen verbunden, einschließlich Kniestabschaden, Riss des Kniestabs und Degeneration des Kniestabs-Oberschenkel-Gelenks. Vorteile der Verwendung von halbsehnigen und dünnen Sehnen schließen eine leichtere Transplantatgewinnung, keine Unterbrechung des Streckmechanismus des Kniegelenks, größere Quadriceps-Stärke ein Jahr nach der Operation und minimaler Verlust der Kniestab-Stärke ein. Das größte Problem sind die Bedenken der Stärke der Fixierung der Sehne innerhalb des Knochentunnels und das Risiko der Transplantatabstoßung an der Fixierungsstelle. Der größte Unterschied zwischen diesen zwei Verfahren der Wiederherstellung des Bandes ist die Fixierung des Transplantates.

[0007] Die Verwendung von BMP zur Erhöhung der Sehne-an-Knochen-Heilung kann in besseren Verfahren zur Verwendung von halbsehnigen und dünnen Sehnen zur ACL-Wiederherstellung resultieren, so dass der Kniestabdefekt und die Unterbrechung des begleitenden Streckmechanismus, die mit der Gewinnung des Kniestabsbandes einhergehen, vermieden wird. Präklinische Beurteilungen deuten an, dass rhBMP-2 die frühe Heilung eines Knochens an ein Sehnen-Transplantat verbessert, wie durch histologische und biomechanische Beurteilung gezeigt. Erhöhte Stärke der Sehne-an-Knochen-Fixierung wird frühere und aggressivere Rehabilitation erlauben, was in einer früheren Rückkehr zu normalen Aktivitäten, zur Arbeit oder dem Sport resultiert.

[0008] Andere allgemeine klinische Beispiele, für die die Erfindung eine direkte Anwendung besitzt, schließen die folgenden ein: Handgelenkmuskelsehnenreparatur für einen festeren Ansatz des Oberarmknochens, Wiederanbindung des Schultergelenkes an das Schulterblatt, Wiederherstellung des seitlichen Knochenbandes mittels eines Sehnentransplantats, das durch Knochentunnel platziert wird, Wiederherstellung des mittleren seitlichen Bandes des Elbengelenks oder Kniegelenks mittels eines an der Oberfläche des Knochens oder durch Knochentunnels fixierten Sehnentransplantats, Wiederherstellung des seitlichen Ellenbandes des Daumens mittels eines in einen Knochentunnel platzierten Sehnentransplantats und Reparatur der Beuger- oder Strecksehnen der Finger in die Knochentunnel oder an die Oberfläche des Knochens der Fingerglieder. Die Erfindung ist breit in jeder Situation anwendbar, in der Bindegewebe (Sehnen, Bänder, Gelenke, Hüllen oder Gelenkkapseln) wieder an Knochen gebunden wird; entweder an die Oberfläche des Knochens oder in einen Tunnel im Knochen.

#### GENAUE BESCHREIBUNG DER ERFINDUNG

[0009] Nach der vorliegenden Erfindung werden Mittel zur Behandlung von Patienten, die Rekonstruktionschirurgie zur Reparatur der funktionalen Bindung

zwischen Bindegewebe und Knochen benötigen, bereitgestellt. Die gemäß der vorliegenden Erfindung hergestellten Zusammensetzungen sind darin vorteilhaft, dass eine Reparatur oder Verbesserung des gesamten Bindungsapparates bewirkt werden kann: die Sehne oder das Band, der benachbarte Knochen sowie die funktionale Bindung. Die Verwendung von Zusammensetzungen umfasst die Verabreichung an die die Rekonstruktionschirurgie benötigende Stelle oder die Stelle eines Defekts, Risses oder Abtrennens des Verbindungsgewebes an den Knochen, eine Menge einer Zusammensetzung, umfassend eines oder mehrere gereinigte knochenbildende Proteine, die wirksam sind, die funktionale Bindung zwischen dem Bindegewebe und dem Knochen zu regenerieren. Die Verwendung der Zusammensetzungen kann weiter die Verabreichung einer Zusammensetzung umfassen, umfassend ein gereinigtes oder rekombinantes knochenbildendes Protein an die die Regeneration benötigende Stelle der Bindung des Bindegewebes an den Knochen in einem geeigneten Träger, so dass das Bindegewebe, der Knochen und der funktionale Bindungsapparat mit vermindertem Faser- oder Granulationsgewebe an der Stelle der auftretenden Anheftung regeneriert werden. Die Zusammensetzung wird bevorzugt zusammen mit einem wirksamen Träger verabreicht. Einer der wichtigsten Vorteile der vorliegenden Erfindung ist, dass sie die kontrollierte Regeneration des Bindegewebes, des Knochens und des funktionalen Bindungsapparates auf beschleunigende Weise erlaubt, so dass die Bindung eine größere funktionale Stärke zu einem früheren Zeitpunkt als mit einem ähnlichen Verfahren, das ohne Zugabe knochenbildender Proteine erfolgt, erlangen kann.

#### KNOCHENBILDENDES PROTEIN

[0010] Das knochenbildende Protein stammt bevorzugt aus der Subklasse von Proteinen, die allgemein als Knochen-morphogenetische Proteine (BMPs) bekannt sind, für die knochenbildende Aktivität und andere Aktivitäten vom Typ Wachstum oder Differenzierung offenbart wurden. Diese BMPs schließen BMP-2, BMP-4, BMP-5, BMP-6, BMP-7, BMP-8, BMP-9, BMP-10, BMP-11, BMP-12 und BMP-13 ein und können auch andere Mitglieder der TGF- $\beta$ -Superfamilie von Proteinen einschließen, wie Wachstums- und Differenzierungsfaktoren, oder GDFs, und MP52. Die Strukturen einer Reihe von BMP-Proteinen sind in den US-Patenten 4,877,864; 5,108,922; 5,013,649; 5,116,738; 5,106,748; 5,187,076; 5,141,905 und in den PCT-Anmeldungen WO91/18098; WO93/00432; WO94/26893 und WO 94/26892 und in den US-Patenten 5,658,882 offenbart. WO88/00205 offenbart Knocheninduktionsfaktorprodukte des Menschen und des Rindes und ihre Verwendung zur Behandlung von Knochen- und Knochenhautdefekten. WO95/16035 zeigte BMP-12 und BMP-13 und Sehnen-induzierende Zusammenset-

zungen davon, während WO96/36710 BMP-15-Zusammensetzungen zur Behandlung von Knochen- und Knorpel- und/oder anderen Bindegewebsdefekten offenbarte. Die Struktur einer Reihe von GDFs ist in WO94/15965; WO94/15949; WO95/01801; WO95/01802; WO94/21681; WO94/15966 offenbart. Die Struktur von MP52 ist in WO93/16099 offenbart. BMP ist bevorzugt BMP-2, dessen Sequenz in dem US-Patent 5,013,649 offenbart ist. Andere im Fachgebiet bekannte BMPs können auch verwendet werden. Zur Zeit ist BMP-2 das am meisten bevorzugte BMP.

[0011] Das BMP kann rekombinant produziert oder aus einer Proteinzusammensetzung gereinigt werden. Das BMP kann homodimer oder heterodimer mit anderen BMPs sein (z. B. ein Heterodimer, zusammengesetzt aus einem Monomer jeweils von BMP-2 und BMP-6) oder mit anderen Mitgliedern der TGF- $\beta$ -Superfamilie, wie Aktivine, Inhibine und TGF- $\beta$ 1 (z. B. ein Heterodimer, zusammengesetzt aus einem Monomer jeweils von einem BMP und einem verwandten Mitglied der TGF- $\beta$ -Superfamilie). Beispiele solcher heterodimerer Proteine sind zum Beispiel in der veröffentlichten PCT-Patentanmeldung WO93/09229 beschrieben.

[0012] Die Menge an hier nützlichem knochenbildendem Protein ist die Menge, die wirksam ist, um erhöhte knochenbildende Aktivität einwandernder Vorläuferzellen zu stimulieren, und wird von der Größe und Art des zu behandelnden Defektes sowie dem verwendeten Träger abhängen. Allgemein liegt die zu liefernde Menge an Protein in einem Bereich von etwa 0.05 bis etwa 1.5 mg.

[0013] In einer bevorzugten Ausführungsform wird das knochenbildende Protein zusammen mit einer wirksamen Menge eines Proteins verabreicht, das die Bildung eines Sehnen- oder Band-ähnlichen Gewebes induzieren kann. Solche Proteine schließen BMP-12, BMP-13 und andere Mitglieder der BMP-12-Subfamilie sowie MP52 ein. Diese Proteine und ihre Verwendung zur Regeneration des Sehnen- oder Band-ähnlichen Gewebes werden im US-Patent 5,658,882 offenbart.

## TRÄGER

[0014] Materialen, die als der Träger zur Durchführung der vorliegenden Erfindung nützlich sein können, schließen pharmazeutisch verträgliche Materialien ein, die eine solche Viskosität und Polarität besitzen, dass, wenn sie zum Knochen-morphogenetischen Protein gegeben werden, sie eine Zusammensetzung bilden, die zur Anwendung an der Stelle der Wiederherstellung der Bindung des Bindegewebes an den Knochen geeignete Gebrauchseigenschaften besitzt (d. h. auch nicht zu flüssig ist, um an der defekten Stelle zu bleiben). Zugabe des Trägers zu dem Knochen-morphogenetischen Protein erlaubt dem Protein, an der Krankheits- oder Läsionsstelle für eine ausreichend lange Zeit zu bleiben, um es dem

Protein zu ermöglichen, die ansonsten natürliche Geschwindigkeit der regenerativen knochenbildenden Aktivität der einwandernden Säuger-Vorläuferzellen zu erhöhen und einen Raum zu bilden, in den neues Gewebe wachsen kann und das Einwachsen von Zellen erlaubt. Der Träger kann auch dem Knochen-morphogenetischen Protein ermöglichen, von der defekten oder Läsionsstelle über ein Zeitintervall abgegeben zu werden, das zur optimalen Erhöhung der Geschwindigkeit der regenerativen knochenbildenden Aktivität der Vorläuferzellen geeignet ist.

[0015] Die am meisten bevorzugte Familie von Trägern umfasst kollagene Materialien. Bevorzugte Kollagenmaterialien schließen Collastat®- und Heliostat®-Kollagenschwämme ein (Integra LifeSciences Corp., Plainsboro, N. J.). Andere Kollagenmaterialien, die zur Verwendung in der vorliegenden Erfindung geeignet sein können, werden in den US-Patenten 5,206,028; 5,024,841; 5,256,418 beschrieben. Der Kollagenträger liegt vorzugsweise in der Form eines Schwammes vor. Der Kollagenschwamm kann vor der Verabreichung durch Eintauchen des Schwammes in das gewünschte Volumen und die gewünschte Konzentration des Proteins für einen geeigneten Zeitraum mit Protein beladen werden. Der Kollagenschwamm wird bevorzugt durch Eintauchen in einem Bereich von etwa 10% bis etwa 150% Vol./Vol. [ml Protein/cc trockener Schwamm], stärker bevorzugt etwa 10 bis etwa 60% Vol./Vol., mit Protein beladen. In einer anderen Ausführungsform kann das Protein an den Kollagenschwamm während der Herstellung adsorbiert werden. In diesem Fall wird das Knochen-morphogenetische Protein bevorzugt zu dem Kollagenschwamm während der Herstellung zugegeben und lyophilisiert, um ein einheitliches Produkt zu bilden. Das Protein wird bevorzugt in einem Verhältnis von etwa 10 bis etwa 150% Vol./Vol. zugegeben, stärker bevorzugt in einem Bereich von etwa 60 bis etwa 80% Vol./Vol.. Andere Formen von Kollagen, die in der vorliegenden Erfindung nützlich sein können, sind Kollagengel und kreuzvernetztes polymeres Kollagen.

[0016] Eine andere bevorzugte Familie von Trägern zur Verabreichung des Knochenmorphogenetischen Proteins sind poröse Polymerpartikel, im Detail im US-Patent 5,171,579 beschrieben. Bevorzugt sind die porösen Polymerpartikel Co-Polymeren von Polymilchsäure oder Polyglycolsäure. Das Protein und die Polymere werden bevorzugt durch ein Sequestriermittel, wie autologes Blut, sequestriert. Ein alternativer Träger, der für die vorliegende Erfindung nützlich ist, ist eine Formulierung von knochenbildendem Protein, porösen Polymerpartikeln und einem anderen Sequestriermittel, wie Cellulosematerial. Andere bevorzugte Sequestrieragenzien schließen Hyaluronsäure, Natriumalginat, Poly(ethylenglycol), Polyoxyethylenoxid, Carboxylvinylpolymer und Poly(vinylalkohol) ein. Am meisten bevorzugt als das Sequestriermittel für diese Ausführungsform ist Carboxymethylcellulose. Diese Zusammensetzungen werden in

der veröffentlichten PCT-Anmeldung WO93/0050 beschrieben. Das Celluloseprotein-Sequestermittel liegt bevorzugt in einer Konzentration von etwa 1 bis etwa 10% (Gew./Vol. Implantat) vor. Das poröse Polymerpartikel/Cellulose-Sequestermittel kann gegebenenfalls weiter mit wässrigem Glycerol als ein Lösungsmittel gemischt werden, bevorzugt in Konzentrationen von etwa 10 bis etwa 80% (Vol./Vol.); und Verhältnisse von Sequestermittel/flüssige Lösungsporöse Polymerpartikel liegen bevorzugt bei etwa 0.1 bis etwa 0.9 (Vol./Vol.). In einer anderen Ausführungsform können die porösen Polymerpartikel in einem verschmolzenen Schwamm gebildet werden, wie in US-Patent 5,520,923 beschrieben. Die Menge an knochenbildendem Protein, das mit porösen Polymerpartikeln verwendet wird, liegt im allgemeinen im Bereich von 0.1 bis 1 mg Protein, bevorzugt 0.05 bis 6 mg Protein für jeden Kubikzentimeter an verwendeter Zusammensetzung.

[0017] Eine andere bevorzugte Familie von Trägern sind Cellulosematerialien, wie Alkylcellulose (einschließlich Hydroxyalkylcellulose), einschließlich Methylcellulose, Ethylcellulose, Hydroxyethylcellulose, Hydroxypropylcellulose, Hydroxypropylmethylcellulose und Carboxymethylcellulose, wobei die am meisten bevorzugte die kationischen Salze von Carboxymethylcellulose (CMC) sind.

[0018] Im Fall von Celluloseträgern und Kollagenen ist es bevorzugt, dass der Träger in Form eines hydratisierten Cellulosegels vorliegt. Die Viskosität kann chemisch oder durch mechanische Mittel erhöht werden, wie starkes Schütteln für einen geeigneten Zeitraum, gefolgt von Autoklavieren. Der BMP- und Celluloseträger liegt bevorzugt in einer Lösung eines geeigneten Puffers vor. Eine bevorzugte Pufferlösung ist eine Zusammensetzung, umfassend, zusätzlich zum knochenbildenden Protein, etwa 1.0 bis etwa 10% (Gew./Vol.) Glycin, etwa 0.1 bis etwa 5.0% (Gew./Vol.) eines Zuckers, bevorzugt Saccharose, etwa 1 bis etwa 20 mM Glutaminsäurehydrochlorid und gegebenenfalls etwa 0.01 bis etwa 0.1% einer nichtionischen grenzflächenaktiven Substanz, wie Polysorbat 80. Bevorzugte Lösungen liegen zwischen etwa 1% und etwa 20% (Gew./Vol.) Celluloseträger/Puffer. Wenn gewünscht, kann ein Salz zugegeben werden. Ein bevorzugter viskoser Gelträger ist in Beispiel 2 nachstehend beschrieben. Die Menge an knochenbildendem Protein, die mit dem viskosen Gelträger brauchbar ist, liegt im allgemeinen in einem Bereich von etwa 0.05 bis etwa 1.5 mg, bevorzugt von etwa 0.1 bis etwa 1.0 mg Kubikzentimeter an erforderlichem Implantatmaterial.

[0019] Andere Materialien, die zur Verwendung als Träger für BMPs in den gemäß der vorliegenden Erfindung hergestellten Zusammensetzungen geeignet sein können, schließen Hyaluronsäure, chirurgische Netze oder Nähte, Polygluconat, Temperatur-empfindliche Polymere, demineralisierter Knochen, Mineralien und Keramik, wie Calciumphosphate, Hydroxyapatit, usw., sowie Kombinationen der vorstehend

beschriebenen Materialien ein.

[0020] In einer bevorzugten Ausführungsform der vorliegenden Erfindung wird jedoch kein Träger verwendet. Stattdessen wird das Protein der vorliegenden Erfindung in einem geeigneten Puffer, wie der vorstehend beschriebene, direkt an die die GeWEBEreparatur benötigende Stelle verabreicht. Zum Beispiel kann das Protein mit einem Pinsel oder einem anderen geeigneten Applikator, wie einer Spritze zur Injektion, verabreicht werden. In einer anderen Ausführungsform kann das Protein direkt an die die GeWEBEreparatur benötigende Stelle verabreicht werden.

[0021] Die folgenden Beispiele beschreiben weiter die Praxis der Ausführungsformen der Erfindung mit BMP-2 in einem Kollagenschwamm-Träger. Die Beispiele sind nicht einschränkend, und, wie vom Fachmann erkannt wird, können sie in Übereinstimmung mit der vorstehenden Beschreibung verändert werden.

## BEISPIELE

Beispiel 1: BMP-2 und Kollagenschwamm-Polymerträger in chirurgisch erzeugten Abtrennungsdefekten von der Sehne an den Knochen

[0022] Zwanzig erwachsene Bastardhunde wurden verwendet. Die langen Zehenstreckungssehnen beider Kniegelenke wurden von ihrer Oberschenkelinsertion abgetrennt und durch ein Bohrloch in die proximale Längenwachstumszone des Schienbeins transplantiert. Die lange Zehenstreckungssehne des Kniegelenks beider Hinterbeine wurde von ihrer Einfügungsstelle in den Oberschenkel abgetrennt und durch einen Knochen tunnel in die proximale Längenwachstumszone des Schienbeins transplantiert. Rekombinantes menschliches BMP-2 (rhBMP-2) wurde an der Verbindungsstelle Sehne-Knochen in einem Bein unter Verwendung von Typ I-Kollagenschwamm als Träger verabreicht [Fig. 1]. Das kontralaterale Bein erhielt den Kollagenschwamm ohne rhBMP-2 [Kontrolle].

[0023] Die Tiere wurden während der Chirurgie betäubt. Das Kniegelenk wurde durch einen seitlichen Einschnitt neben der Kniescheibe angegangen; die lange Zehengliedstreckunsehne wurde identifiziert und wurde dann von ihrer Einfügung in den seitlichen Oberschenkelgelenkkopf durch scharfen Schnitt abgetrennt. Die Bündel über den vorderen Schienbeinmuskel wurde dann eingeschnitten, und der Muskel wurde seitlich zurückgezogen. Ein Bohrloch, 4.8 mm Durchmesser, wurde in der proximalen Längenwachstumszone des Schienbeins in einem 45 Grad-Winkel zur Längenachse des Knochens gemacht. Helistat®-Kollagenschwamm wurde mit rekombinantem menschlichem BMP-2 (rhBMP-2) beladen, und der Schwamm wurde dann um die abgetrennte Sehne gewickelt. Das freie Ende der Sehne wurde manuell durch das Bohrloch gezogen und wur-

de unter Spannung auf der medialen Seite der proximalen Längenwachstumszone des Schienbeins mit einfachen unterbrochenen Nähten von 4–0 rostfreiem Stahl fixiert. Die Sehne passte gut in den Knochen-tunnel und war in Kontakt mit dem Knochen durch die Länge des Tunnels. Die Gelenkkapsel, das Bündel und die subkutanen Gewebe wurden mit unterbrochenen Nähten von 3–0 Chromfaden geschlossen, und die Haut wurde mit unterbrochenen Nähten von 3–0 rostfreiem Stahl geschlossen. Das Vorgehen wurde dann am anderen Knie durchgeführt. Die Beine wurden nicht ruhiggestellt, und den Hunden wurde erlaubt, sich je nach Lust in einzelnen Zimmerausläufen zu bewegen.

[0024] Acht Hunde wurden nach zwei und vier Wochen getötet; vier Hunde wurden nach acht Wochen getötet. Hochauflösende Radiographien wurden gemacht, und mikroskopische Schnitte der Verbindungsstelle Sehne-Knochen wurden unter Licht und polarisiertem Lichtmikroskop untersucht. Tetracyclin-markierte Schnitte wurden unter dem Fluoreszenzmikroskop untersucht. Biomechanisches Aus-testen des maximalen Beladens versus Misslingens wurden für die Zwei- und Vier-Wochen-Proben auf einem MTS-Materialien-Testgerät in einer Spannungs-rate von 50.8 mm/Sekunde durchgeführt. Die miss-lingenen Beladungen wurden gemittelt, und die mit rhBMP-2 behandelte Seite wurde mit der Kontrollseite mittels eines Student's Paarungstests verglichen.

[0025] Ergebnisse: Serielle histologische Analyse zeigte eine ausgiebige Proliferation von Fibroblasten, runden Osteoblasten-ähnlichen Zellen und Trabekeln von neuem Knochen an der Verbindungsstelle Sehne-Knochen in den rh-BMP-2-behandelten Beinen, verglichen mit den Beinen, die nur den Kollagen-Träger erhielten. Bei fortschreitendem Heilungsprozess reiften die Trabekel des neuen Knochens an der Verbindungsstelle in den rhBMP-2-behandelten Beinen und kamen näher an die Sehne, während es in dem Bein ohne rhBMP-2 eine Zone von Faser- oder Gra-nulationsgewebe gab, das die Sehne und den Knochen-tunnel trennte. Von Kossa-gefärbte Schnitte und Fluoreszenzmikroskopie Fluorochrom-markierter Proben zeigten fortschreitende Mineralisierung des neu gebildeten Knochens an der Verbindungsstelle Sehne-Knochen. Hochauflösende Radiographien zeigten, dass während des Knocheninduktionsvor-ganges der schon existierende lamellare Knochen wiederaufgenommen wurde, und es wurde beobach-tet, dass neuer Knochen fortschreitend in den Vier- und Acht-Wochen-rhBMP-2-Proben mineralisierte. Es gab keinen Hinweis einer Immunantwort des Wir-tes auf das Kollagen-Implantat.

[0026] Gepaarte Vergleiche der maximalen Bruch-kraft (In zeigten, dass die rhBMP-2-behandelten Beine sowohl in den Zwei-Wochen-Proben ( $p=0.035$ ) als auch den Vier-Wochen-Proben ( $p=0.05$ ) bedeutend stärker waren. Es gab eine statistisch bedeutende Er-höhung der Kraft von zwei bis vier Wochen in den rhBMP-2-behandelten Beinen ( $p=0.02$ ) und den Kon-

trollbeinen ( $p=0.005$ ) [Fig. 2].

[0027] Diskussion: Knochen-morphogenetisches Protein verstärkt die Heilung eines Sehnentransplan-tats in einem Knochen-tunnel. Eine frühere Untersu-chung der Heilung der Verbindung Sehne-Knochen zeigte eine Fasergewebe-verbindung zwischen der Sehne und dem Knochen. In der vorliegenden Unter-suchung induzierte rhBMP-2 ausgiebige Ablagerung neuen Knochens am Verbindungs-gewebe, was in ei-nem näheren Anfingen des Knochens an die Sehne zu früheren Zeitpunkten und einer regelmäßigeren Entstehung von Sharpey'schen Fasern zwischen der Sehne und dem Knochen in den rhBMP-2-behandel-ten Beinen resultiert. Die erhöhte Stärke der Fixie-rung korreliert mit dem histologischen Grad des Kno-cheneinwachsens, der in den rhBMP-2-behandelten Beinen beobachtet wird.

## Patentansprüche

1. Verwendung eines oder mehrerer morphogenetischer Knochenproteine (BMP) für die Herstellung eines Arzneimittels zur Regeneration einer funktionalen Bindung zwischen Bindegewebe oder Sehne und Knochen, mit der Maßgabe, dass die BMPs nicht BMP-12, BMP-13 oder BMP-15 einschließen.
2. Verwendung nach Anspruch 1, wobei das Arz-neimittel weiterhin ein Protein umfasst, das in der Lage ist, die Bildung eines sehnens- oder bandähnlichen Gewebes zu induzieren.
3. Verwendung nach Anspruch 1 oder 2, wobei das Arzneimittel das rekombinante menschliche BMP-2 umfasst.
4. Verwendung nach Anspruch 2 oder 3, wobei das Protein, das in der Lage ist, die Bildung eines sehnens- oder bandähnlichen Gewebes zu induzie-ren, MP52 ist.
5. Verwendung nach einem der Ansprüche 2 bis 4, wobei das BMP und das Protein, das in der Lage ist, die Bildung eines sehnens- oder bandähnlichen Gewebes zu induzieren, Heterodimere bilden.
6. Verwendung nach einem der Ansprüche 1 bis 5, wobei das Arzneimittel weiterhin einen geeigneten Träger umfasst.
7. Verwendung nach Anspruch 6, wobei der Träger kollagene Materialien umfasst, vorzugsweise in Form eines Schwammes, oder poröse Polymerpartikel und ein Sequestermittel.
8. Verwendung nach Anspruch 6, wobei der Träger ein viskoses Cellulosegel ist.
9. Verwendung nach Anspruch 7, wobei das Se-questermittel ein Cellulosematerial oder autologes

DE 696 29 294 T2 2004.04.29

Blut ist.

Es folgen 2 Blatt Zeichnungen

Fig.1

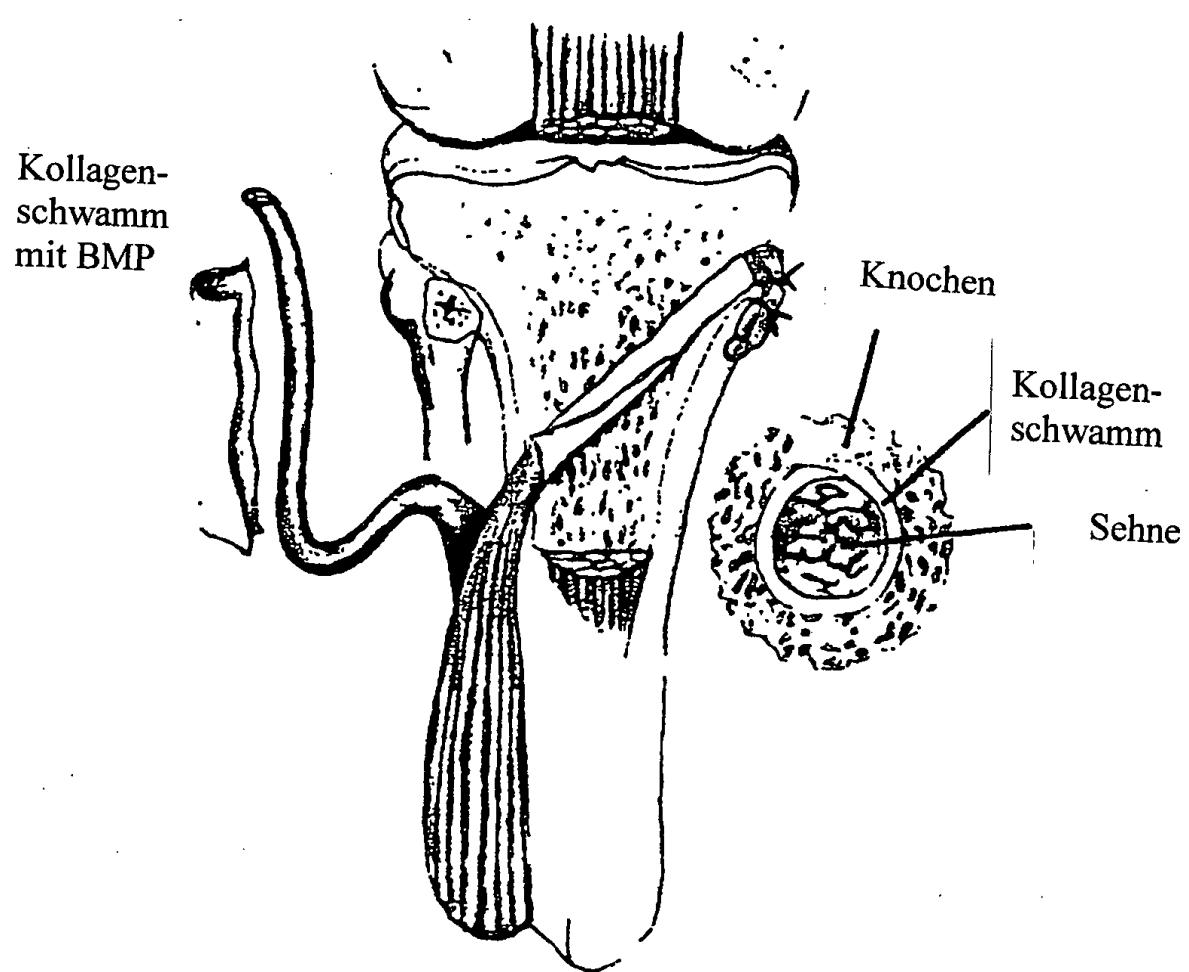


Fig.2

