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

(10) **DE 694 32 596 T2** 2004.03.18

(12) # Übersetzung der europäischen Patentschrift

(97) **EP 0 724 459 B1**
(21) Deutsches Aktenzeichen: **694 32 596.1**
(86) PCT-Aktenzeichen: **PCT/US94/09870**
(96) Europäisches Aktenzeichen: **94 930 410.9**
(87) PCT-Veröffentlichungs-Nr.: **WO 95/007108**
(86) PCT-Anmeldetag: **02.09.1994**
(87) Veröffentlichungstag der PCT-Anmeldung: **16.03.1995**
(97) Erstveröffentlichung durch das EPA: **07.08.1996**
(97) Veröffentlichungstag der Patenterteilung beim EPA: **02.05.2003**
(47) Veröffentlichungstag im Patentblatt: **18.03.2004**

(51) Int Cl.[7]: **A61L 27/00**
A61K 38/18, A61P 19/00

(30) Unionspriorität:
119772 10.09.1993 US

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

(73) Patentinhaber:
Genetics Institute, LLC, Cambridge, Mass., US

(74) Vertreter:
Reitstötter, Kinzebach & Partner (GbR), 81679 München

(72) Erfinder:
YIM, Kalvin W. K., North Andover, US; HUBERTY, Michael C., Kiel, US; NORTHEY, Jr., Richard P., Ipswich, US; KENLEY, Richard A., San Diego, US; SCHRIER, Jay A., Lexington, US; SMITH, Jennifer L., Reading, US; STECKERT, John J., Andover, US; PHILBROOK, C. Michael, Boston, US; DESOUZA, Patrick Joseph, Andover, US

(54) Bezeichnung: **ZUSAMMENSETZUNGEN FÜR VERABREICHUNG VON OSTEOGENEN PROTEINEN**

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

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

Beschreibung

Hintergrund der Erfindung

[0001] Der Gegenstand der Erfindung betrifft den Bereich der osteogenen Proteine und pharmazeutische Formulierungen davon. Insbesondere bezieht der Gegenstand der Erfindung pharmazeutische Formulierungen ein, welche konstruiert wurden, um osteogene Proteine in situ für eine Zeit zu maskieren, welche ausreichend ist, es dem Protein zu erlauben, Knorpel- und/oder Knochenbildung herbeizuführen.

[0002] Osteogene Proteine sind jene Proteine, welche in der Lage sind, beim Herbeiführen von Knorpel und/oder Knochenbildung zu assistieren oder diese herbeizuführen. Viele solcher osteogenen Proteine sind in den letzten Jahren isoliert und gekennzeichnet worden und einige sind durch Rekombinantverfahren hergestellt worden. Zum Beispiel sind sogenannte morphogene Knochenproteine (BMP) aus entmineralisiertem Knochengewebe isoliert worden (siehe z. B. Urist US-4455256); eine Anzahl solcher BMP-Proteine ist durch Rekombinanttechniken hergestellt worden (siehe z. B. Wang et al., US-4877864 und Wang et al., US-5013549); eine Familie von transformierenden Wachstumsfaktoren (TGF-α und TGF-β) ist als potentiell brauchbar bei der Behandlung von Knochenerkrankung identifiziert worden (siehe z. B. Derynck et al., EP-154434); von einem als Vgr-l bezeichneten Protein ist befunden worden, dass es bei hohen Graden in osteogenen Zellen exprimiert wird (siehe Lyons et al. (1989) Proc. Nat'l. Acad. Sci. USA 86, 4554–4558); und als OP-1, COP-5 und COP-7 bezeichnete Proteine haben scheinbar Knochen herbeiführende Wirksamkeit gezeigt (siehe Oppermann et al., US-5001691).

[0003] Es sind verschiedene Versuche gemacht worden, Formulierungen zu entwickeln, welche konstruiert sind, um osteogene Proteine an eine Stelle zu übertragen, wo Herbeiführung von Knochenbildung gewünscht wird. Zum Beispiel sind bestimmte polymere Matrizes wie Acrylesterpolymer (Urist, US-4526909) und Milchsäurepolymer (Urist, US-4563489) genutzt worden, aber diese Formulierungen maskieren des osteogene Proteine nicht für eine Zeit, welche ausreichend ist, um Knochenbildung optimal herbeizuführen, und ferner ist von ihnen befunden worden, dass die für optimale Knochenbildung zu langsam erodieren.

[0004] Eine biologisch abbaubare Matrix aus porösen Partikeln zur Übertragung eines osteogenen Proteins, bezeichnet als OP, wird in Kuberasampath, US-5108753, offenbart. Während US-5108753 offenbart, dass ein erfolgreicher Träger für OP das Protein binden, als langsames Abgabe-Übertragungssystem fungieren, jeden Schritt der zellulären Response während der Knochenentwicklung akkomodieren und das Protein vor unspezifischer Proteolyse schützen muss, werden keine Formulierungen vorgeschlagen, welche Bestandteile enthalten, die das OP speziell an der Stelle maskieren, wo Knochenbildung erwünscht wird.

[0005] Ron et al., US-Patent 5171579 offenbaren, dass der durchschnittliche Oberflächenbereich pro porösem Partikel kritisch ist, Knochenbildung zu optimieren.

[0006] Okada et al., US-4652441, US-4711782, US-4917893 und US-5061492 und Yamamoto et al., US-4954298 offenbaren eine Mikrokapsel mit verlängerter Abgabe, welche eine Polypeptid-Arznei und eine Arznei zurückhaltende Substanz umfasst, eingekapselt in einer inneren wässerigen Schicht, umgeben von einer Polymerwandsubstanz in einer äußeren Ölschicht. Obwohl morphogenes Knochenprotein als Polypeptid aufgeführt ist, welches zu solch einer Bildung in der Lage ist, verhindert Mikroeinkapselung von osteogenen Proteinen kontrollierte Abgabe von solchen Proteinen, welche für optimale Knochenbildung ausreichend ist.

[0007] Yamazaki et al., Clin Orthop. and Related Research, 234 :240– 249 (1988) offenbaren die Verwendung von Implantaten, welche 1 mg von Knochen gereinigtes morphogenes Knochenprotein und 5 mg Gips umfassen. US-Patent 4645503 offenbart Verbundstoffe aus Hydroxyapatit und Gips als Knochenimplantatmaterialien.

[0008] Collagen-Matrizes sind ebenfalls als Übertragungsvehikel für osteogene Proteine verwendet worden (siehe z. B. Jeffries, US-4394370), aber Collagen verursacht häufig unerwünschte antigene Reaktionen in Patienten. Daher bleibt ein Bedarf für eine pharmazeutische Formulierung, welche in der Lage ist, osteogene Proteine an einer Stelle zu maskieren, wo Herbeiführung von Knochenbildung gewünscht ist, und zwar für einen Zeitraum, welcher ausreichend ist, um sichere, wirksame Herbeiführung solcher Knochenbildung zu erlauben.

Zusammenfassung der Erfindung

[0009] Der Anmelder hat überraschend herausgefunden, dass eine verbesserte Formulierung von BMPs, insbesondere BMP-2, welche verbesserte Löslichkeits- und Stabilitätsmerkmale hat, unter Verwendung einer Zusammensetzung aus Glycin, Saccharose und Glutaminsäurehydrochlorid bei einem pH von weniger als 6,0 erreicht werden kann. In einer bevorzugten Ausführungsform der Erfindung umfasst diese Formulierung etwa 2,5% Glycin (g/100 ml (w/v), etwa 0,5% Saccharose (w/v), etwa 5 mM Glutaminsäurehydrochlorid (etwa 0,1% w/v), und etwa 0,01% (v/v) Polysorbat 80, bei einem pH von etwa 4,5.

[0010] Die Zusammensetzungen der vorliegenden Erfindung sind brauchbar für die Herstellung von Formulierungen von osteoinduktiven Proteinen, welche neben anderen Verwendungen verwendet werden können,

um die Bildung von Knorpel und/oder Knochen zum Reparieren von Gewebeschaden und Frakturen zu fördern.

Detaillierte Beschreibung der Erfindung

[0011] In US-Patent 5171579 wird offenbart, dass osteogene Proteine an einer Stelle maskiert werden können, wo Knochen herbeiführende Wirksamkeit unter Verwendung autogenen Bluts gewünscht wird, ohne antifibrinolytische Wirkstoffe zu verwenden, vorausgesetzt dass eine poröse, partikuläre Polymermatrix in die Formulierung eingeschlossen wird.

[0012] Die osteogenen Proteine, welche in der Praxis des Gegenstands der Erfindung brauchbar sind, sind den Fachleuten gut bekannt und schließen die oben diskutierten ein. Die bevorzugten osteogenen Proteine zur Verwendung hierin sind jene der BMP-Klasse, welche in US-4877864, US-5013649; WO-90/11366, veröffentlicht am 4. Oktober 1990; WO-91/18098, veröffentlicht am 28. November und WO-93/00432, veröffentlicht am 7. Januar 1993 als BMP-1 bis BMP-10 identifiziert worden sind. Das am meisten bevorzugte ist BMP-2, dessen cDNA-Sequenz in voller Länge detailliert im '649 Patent beschrieben wird. Natürlich können Kombinationen von zwei oder mehreren solcher osteogenen Proteine verwendet werden, wie auch Fragmente von solchen Proteinen, die ebenfalls osteogene Wirksamkeit aufweisen. Von solchen osteogenen Proteinen ist bekannt, dass sie homodimere Arten sind, aber auch Wirksamkeit als gemischte Heterodimere aufweisen. Heterodimere Formen von osteogenen Proteinen können in der Praxis des Gegenstands der Erfindung ebenfalls verwendet werden. BMP-Heterodimere werden in WO-93/09229 beschrieben. Rekombinierte Proteine werden gegenüber natürlich vorkommenden isolierten Proteinen bevorzugt. Die Menge an hierbei brauchbarem osteogenen Protein ist die Menge, welche wirksam ist, gesteigerte osteogene Aktivität von infiltrierenden Progenitorzellen zu stimulieren, und wird von der Größe und Art des behandelten Defekts abhängen, wie unten detaillierter diskutiert wird.

[0013] Die osteogenen Proteine können in Form einer pharmazeutisch annehmbaren Lösung (einschließlich Rekonstitutionen aus einer lyophilisierten Form) genutzt werden. Es ist optimal, das osteogene Protein bei Konzentrationen von mindestens etwa 1 mg/ml, vorzugsweise 2 bis 8 mg/ml zu lösen, so dass eine pharmazeutisch wirksame Menge an Protein übertragen werden kann, ohne dass unangemessene Volumina an Träger notwendig sind. Für einige Anwendungen können Konzentrationen über 2 mg/ml wünschenswert sein.

[0014] Glutaminsäurehydrochlorid (HCl) ist das Lösungsmittel. Es wird in Konzentrationen von etwa 1 bis etwa 20 mM (etwa 0,02 bis etwa 0,37% w/v), vorzugsweise etwa 5 bis etwa 10 mM (etwa 0,1 bis etwa 1,8% w/v), und bei einem pH von weniger als etwa 6,0, vorzugsweise etwa 3,5 bis etwa 5,25, bevorzugt etwa 4,5 verwendet. Die Zusammensetzung schließt ebenfalls etwa 0,1 bis etwa 5,0% (w/v), vorzugsweise etwa 0,5 bis etwa 2% Zucker; bevorzugt etwa 0,5% Saccharose; und etwa 0,5 bis etwa 10,0% (w/v) Glycin, bevorzugt etwa 2,0 bis etwa 2,5% ein. Um die Bildung von Teilchen zu verhindern, kann die Glutaminsäurehydrochloridlösung gegebenenfalls etwa 0,01 bis etwa 0,1% (w/v) eines nicht-ionischen Surfaktanten wie Polyoxyester einschließen, zum Beispiel Polysorbat® 80, Polysorbat® 20 oder Pluronic® F-68. Das Saccharose/Glycin-Verhältnis kann variiert werden, um für die Zusammensetzung Feuchtigkeitsgehalt und Massemerkmale vorzusehen. Andere Bestandteile können in den Zusammensetzungen der vorliegenden Erfindung substituiert werden. Zum Beispiel kann anstelle der Glutaminsäure eine einwertige Säure mit pKa nahe 4,5 wie Essigsäure verwendet werden. Zweiwertige Säure wie Bernsteinsäure kann verwendet werden, aber bei einer niedrigeren Konzentration (eher etwa 1 mM bevorzugt als etwa 5 mM). Wenn Glutaminsäurehydrochlorid verwendet wird, können entweder Glutaminsäure/hydrochlorid oder Gemische aus Glutaminsäure und HCl verwendet werden. Glutaminsäurehydrochlorid kann auch in Hydratform verwendet werden, wie Glutaminsäurehydrochlorid-monohydrat. Mit geringeren Modifikationen können Glutaminsäure oder Glutamate, zum Beispiel Natriumglutamat anstelle von Glutaminsäurehydrochlorid verwendet werden. Glycin kann ganz oder teilweise durch andere Aminosäuren mit ähnlicher Ladung ersetzt werden. Zusätzlich können weitere optionale Bestandteile wie Albumin, Glycerol, Mannitol und andere Zucker zugegeben werden. So schließt die vorliegende Erfindung Zusammensetzungen ein, welche substituierte Bestandteile wie oben beschrieben einsetzen, zum Beispiel Zusammensetzungen, welche Glutaminsäure oder Natriumglutamat anstelle von Glutaminsäurehydrochlorid verwenden. Weitere Modifikationen werden den Fachleuten offensichtlich sein und werden ebenfalls durch die vorliegende Erfindung eingeschlossen.

[0015] Die obigen Formulierungen können lyophilisiert und mit Wasser rekonstituiert werden, was Vorteile bei der Lagerung, dem Transport und der Stabilität vorsieht. Lyophilisierte Formulierungen der vorliegenden Erfindung können die folgende Zusammensetzung umfassen: etwa 3,12 Gew.-% bis etwa 24,38 Gew.-% BMP; etwa 0,52 Gew.-% bis etwa 10,27 Gew.-%, vorzugsweise etwa 1,84% bis 5,27% (w/w) Glutaminsäurehydrochlorid; etwa 38,4 Gew.-% bis etwa 75,7 Gew.-% Glycin; etwa 14,28 Gew.-% bis etwa 47,15 Gew.-% Saccharose; und gegebenenfalls etwa 0,15 Gew.-% bis etwa 2,94 Gew.-% Polysorbat 80. Zum Beispiel werden zwei bevorzugte Zusammensetzungen der lyophilisierten Formulierung in Tabelle 1 unten aufgelistet:

[0016]

Tabelle 1

a. 4,0 mg-ml Formulierung	
BMP-2	4,0 mg/ml (11,42 Gew.-%)
Glutaminsäure HCl	0,918 mg/ml (2,62 Gew.-%)
Glycin	25 mg/ml (71,39 Gew.-%)
Saccharose	5 mg/ml (14,28 Gew.-%)
Polysorbat 80	0,1 mg/ml (0,29 Gew.-%)
b. 2,0 mg/ml Formulierung	
BMP-2	2,0 mg/ml (6,06 Gew.-%)
Glutaminsäure HCl	0,918 mg/ml (2,78 Gew.-%)
Glycin	25 mg/ml (75,72 Gew.-%)
Saccharose	5 mg/ml (15,14 Gew.-%)
Polysorbat 80	0,1 mg/ml (0,30 Gew.-%)

[0017] Die obigen Formulierungen können in weniger als 40 Stunden mit gut kontrollierten Feuchtigkeitsgraden reproduzierbar lyophilisiert werden. Die Formulierungen sehen gute Lagerungsstabilität bei einer Vielfalt an Temperaturen vor. Die obigen Formulierungen sehen ferner höhere Löslichkeit von BMP vor, was Unterstützung für die Verabreichung von höheren Dosen von BMP vorsieht, und zeigen gute Kompatibilität mit den oben beschriebenen Mitteln. Bei geringeren Variationen und Modifikationen innerhalb der vorliegenden Erfindung kann die obige Formulierung verwendet werden, um Lösungen mit höheren Konzentrationen von mindestens etwa 4 mg/ml BMP-2 oder anderen BMPs herzustellen.

[0018] Verschiedene gut bekannte Verfahren können verwendet werden, um das osteogene Protein und die Lösungmittel zur Verwendung hierin zu vermischen, einschließlich aber nicht begrenzt auf Ultrafiltration, Dialyse, Gelfiltration und hydrophobe Interaktionschromatographie.

[0019] US-Patent 5171579 offenbart, dass der durchschnittliche Oberflächenbereich pro porösem Partikel kritisch ist, um Knochenbildung zu optimieren. Speziell sollten poröse Partikel, welche bei Knochenbildung gemäß der vorliegenden Erfindung brauchbar sind, einen durchschnittlichen Oberflächenbereich von etwa 0,02 bis 4 m^2/g haben. WO-93/06872 offenbart ferner, dass es möglich ist, poröse Partikel mit dem gewünschten Oberflächenbereich herzustellen, indem ein „Porosigen" (Zusammensetzung, welche in der Lage ist, durch Erhöhen des Oberflächenbereichs des Partikels Porosität zu verleihen) in die Lösung eingeführt wird, welche zum Herstellen der porösen Partikel verwendet wird. Die Offenbarung der obigen Veröffentlichungen wird hiermit durch Verweis eingeschlossen. Es ist ebenfalls möglich, die biologische Erosionsgeschwindigkeit durch Unterwerfen der porösen Partikel unter sterilisierende Dosen von γ-Bestrahlung zu kontrollieren. Je höher die γ-Bestrahlungsdosis, desto schneller die biologische Erosion. Partikel, welche hierfür brauchbar sind, haben eine solche Porosität, dass der Oberflächenbereich der Partikel gegenüber dem Oberflächenbereich von nicht porösen Partikel von vergleichbarer Größe etwa 2–250 fach erhöht ist.

[0020] Die Formulierungen des Gegenstands der Erfindung sehen verformbare Implantate vor, die es erlauben, dass therapeutisch wirksame Mengen an osteoinduktivem Protein an eine verletzte Stelle übertragen werden, wo Knorpel- und/oder Knochenbildung erwünscht ist. Solch ein Implantat kann als Ersatz für autologes Knochentransplantat in frischen und Nicht-Verbindungsfrakturen, Spinalfusionen und Knochendefektbehebung im orthopädischen Bereich; in Kranio-/maxillofacialen Rekonstruktionen; zur Prothesenintegration, insbesondere als Oberflächenüberzug, um Fixation des prothetischen Implantats zu verbessern, wie Hydroxylapatit-überzogene Prothesen; bei Osteomyelitis zur Knochenregeneration; und im dentalen Bereich zur Erhöhung des alveolaren Kamms und periodontalen Defekten und Zahnextraktionshöhlen verwendet werden. Wenn es zur Behandlung von Osteomyelitis oder zur Knochenreparatur mit minimalen Infektionen verwendet wird, kann das osteogene Protein in Kombination mit porösen Mikropartikeln und Antibiotika mit der Zugabe von Proteinmaskierenden Wirkstoffen wie Alginat, Cellulosederivaten, insbesondere Carboxymethylcellulose, verdünnt unter Verwendung von wässerigem Glycerol verwendet werden. Das Antibiotikum wird hinsichtlich seiner Fähigkeit ausgewählt, Infektionen zu verringern, während es minimale nachteilige Auswirkungen auf die Knochenbildung hat. Bevorzugte Antibiotika zur Verwendung in den Mitteln der vorliegenden Erfindung schließen Vancomycin und Gentamycin ein. Das Antibiotikum kann in jeder pharmazeutisch annehmbaren Form sein, wie Vancomycin-HCl oder Gentamycinsulfat. Das Antibiotikum ist vorzugsweise in einer Konzentration von etwa 0,1 mg/ml bis etwa 10,0 mg/ml vorhanden.

[0021] Die Formulierungen mit niedrigerer Viskosität können auch als perkutane Injektion verwendet werden, um Heilen von geschlossenen Frakturen zu beschleunigen. In bestimmten dieser Verwendungen können die Zusammensetzungen des Gegenstands der Erfindung in Kombination mit verschiedenen Knochenzementen verwendet werden, einschließlich erodierbaren Knochenzementen wie Poly(propylen-co-fumarat) und bestimmten Hydroxyapatit-Zementen. Auch werden bestimmte dieser Verwendungen biologisch erodierbare Bauelemente nutzen, wie erodierbare Platten, Schrauben usw. Wie oben angedeutet, wird der Dosierungsplan

durch die zu adressierende klinische Indikation bestimmt werden, als auch durch verschiedene Patientenvariablen (z. B. Gewicht, Alter, Geschlecht) und klinische Präsentation (z. B. Ausmaß der Verletzung, Stelle der Verletzung usw.). Im Allgemeinen wird die Dosierung von osteogenem Protein im Bereich von etwa 10 bis 1000 µg liegen, vorzugsweise von etwa 10 bis 100 µg.

[0022] Die folgenden Beispiele sind für die vorliegende Erfindung veranschaulichend und in keinster Weise eingrenzend. Modifikationen, Variationen und geringere Verstärkungen werden in Erwägung gezogen und befinden sich innerhalb der vorliegenden Erfindung.

Beispiel 1

Formulierung von BMP unter Verwendung von Glutaminsäure-HCl

[0023] Rekombinant herstelltes BMP-2 wird in einer Zusammensetzung aus 2,5% (w/v) Glycin, 0,5% (w/v) Saccharose, 0,01% (w/v) Polysorbat 80 und 5 mM (etwa 0,092% w/v) Glutaminsäure-HCl bei pH = 4,5 gelöst (2 mg/ml).

Beispiel 2

[0024] Löslichkeit und Stabilität von BMP-Formulierungen unter Verwendung von Glutaminsäure-HCl als Lösungsmittel Die obigen Zusammensetzungen von Beispiel 1 werden lyophilisiert und bei –80, 4, 30 und 40°C gelagert. Die lyophilisierten Proben werden vor der Rekonstitution auf Erscheinung überprüft. Alle erschienen als gute weiße Kuchen und veränderten sich nicht mit der Zeit oder Temperatur.

[0025] Die Zusammensetzungen wurden nach 2 Wochen, 1 Monat, 3 Monaten und 4,5 Monaten nach Lyophilisation rekonstituiert und hinsichtlich ihrer Rekonstitutionszeit, Teilchenbildung, pH nach Rekonstitution, % Feuchtigkeitsgehalt, Konzentration von BMP-2 nach Rekonstitution, % Aggregatbildung und spezifische Wirksamkeit im W-20 Biotest für BMP-Wirksamkeit untersucht.

[0026] Die obigen Zusammensetzungen rekonstituierten sich innerhalb von 10–30 Sekunden, selbst nach 4,5 Monaten Lagerung. Nach Rekonstitution zeigten die Zusammensetzungen keine sichtbaren Teilchen, wenig oder keine Veränderung des Feuchtigkeitsgehalts, wenig oder keinen Verlust von Protein, niedrige Grade an Aggregaten und sind in dem W20-Biotest wirksam.

W-20 Biotest

A. Beschreibung von W-20 Zellen

[0027] Die Verwendung der W-20 Knochenmark-Bindegewebszellen als Indikatorzelllinie basiert auf der Umwandlung dieser Zellen in Osteoblast-ähnliche Zellen nach Behandlung mit einem BMP-Protein [Thies et al., Journal of Bone and Mineral Research, 5: 305 (1990); und Thies et al., Endocrinology, 130; 1318 (1992)]. Speziell sind W-20 Zellen eine klonale Knochenmark-Bindegewebszelllinie, abgeleitet von erwachsenen Mäusen durch Forscher im Labor des Dr. D. Nathan, Children's Hospital, Boston, MA. Die Behandlung von W-20 Zellen mit bestimmten BMP-Proteinen ergibt (1) gesteigerte alkalische Phosphataseproduktion, (2) Herbeiführen von PTH-stimuliertem cAMP und (3) Herbeiführung von Osteocalcinsynthese durch die Zellen. Während (1) und (2) Merkmale darstellen, welche mit dem Osteoblast-Phenotyp in Verbindung gebracht werden, ist die Fähigkeit, Osetocalcin zu synthetisieren eine phenotypische Eigenschaft, die nur durch reife Osteoblasten gezeigt wird. Ferner haben wir bis heute Umwandlung von W-20 Bindegewebszellen in Osteoblast-ähnliche Zellen nur bei Behandlung mit BMPs beobachtet. Auf diese Weise korrelieren die in vitro Wirksamkeiten, welche durch die mit BMP behandelten W-20 Zellen gezeigt wurden, mit der für BMPs bekannten in vivo Knochenbildungsaktivität.

[0028] Unten werden zwei in vitro Tests beschrieben, welche im Vergleich von BMP-Wirksamkeiten von Formulierungen von BMPs mit den Wirksamkeiten von bekannten BMPs brauchbar sind

B. W-20 Alkalisches Phosphatasetestprotokoll

[0029] W-20 Zellen werden in Gewebekulturplatten mit 96 Mulden bei einer Dichte von 10000 Zellen pro Mulde in 200 µl Medien (DME mit 10% durch Hitze inaktiviertem fötalen Kalbserum, 2 mM Glutamin und 100 Einheiten/ml Penicillin + 100 µg/ml Streptomycin) plattiert. Die Zellen dürfen sich über Nacht in einem 95% Luft, 5% CO_2 Inkubator bei 37°C anhaften.

[0030] Die 200 µl Medien werden aus jeder Mulde mit einem Multikanal-Pipettor entfernt und mit einem gleichen Volumen an Testprobe, übertragen in DME mit 10% durch Hitze inaktiviertem fötalem Kalbserum, 2 mM Glutamin und 1% Penicillin-Streptomycin ersetzt. Die Testsubstanzen werden in dreifacher Ausführung getes-

tet.

[0031] Den Testproben und Standards wird ein 24 Stunden Inkubationszeitraum mit den W-20 Indikatorzellen erlaubt. Nach den 24 Stunden werden die Platten aus dem 37°C Inkubator entfernt und die Testmedien werden von den Zellen entfernt.

[0032] Die W-20 Zellschichten werden 3 Mal mit 200 µl pro Mulde von Calcium/Magnesium-freier Phosphat gepufferter Kochsalzlösung gewaschen und diese Wäschen werden verworfen.

[0033] 50 µl von Glas-destilliertem Wasser werden zu jeder Mulde zugegeben und die Testplatten werden dann auf ein Trockeneis/Ethanol-Bad zum Blitzgefrieren platziert. Einmal gefroren werden die Testplatten von dem Trockeneis/Ethanol-Bad entfernt und bei 37°C aufgetaut. Dieser Schritt wird 2 weitere Male für insgesamt 3 Frost-Tau-Verfahren wiederholt. Einmal abgeschlossen ist die an die Membran gebundene alkalische Phosphatase für Messungen verfügbar.

[0034] 50 µl Testgemisch (50 mM Glycin, 0,05% Triton X-100, 4 mM $MgCl_2$, 5 mM p-Nitrophenolphosphat, pH = 10,3) werden zu jeder Testmulde zugegeben und die Testplatten werde dann für 30 Minuten bei 37°C in einem schüttelnden Wasserbad bei 60 Oszillationen pro Minute inkubiert.

[0035] Am Ende der 30 Minuten Inkubation wird die Umsetzung durch Zugeben von 100 µl von 0,2 N NaOH zu jeder Mulde und Platzieren der Testplatten auf Eis gestoppt.

[0036] Die spektrophotometrische Absorption für jede Mulde wird an einer Wellenlänge von 405 Nanometern abgelesen. Diese Werte werden dann mit bekannten Standards verglichen, um eine Schätzung der Wirksamkeit der alkalischen Phosphatase in jeder Probe zu ergeben. Zum Beispiel werden unter Verwendung von bekannten Mengen an p-Nitrophenolphosphat Absorptionswerte erzeugt. Dies wird in Tabelle 3 gezeigt.

Tabelle 3

Absorptionswerte für bekannte Standards von p-Nitrophenolphosphat

p-Nitrophenolphosphat uMol	Mittlere Absorption (405 nm)
0,000	0,000
0,006	0,261 +/- 0,024
0,012	0,521 +/- 0,031
0,018	0,797 +/- 0,063
0,024	1,074 +/- 0,061
0,030	1,305 +/- 0,083

[0037] Absorptionswerte für bekannte Mengen an BMPs können bestimmt werden und zu µMol von p-Nitrphenolphosphat, gespalten pro Zeiteinheit umgewandelt werden, wie in Tabelle 4 gezeigt.

Tabelle 4

Alkalische Phosphatasewerte für W-20 Zellenbehandlung mit BMP-2		
BMP-2 Konzentration	Absorptionsablesung	uMol Substrat
ng/ml	405 nMeter	pro Stunde
0,000	0,645	0,024
1,560	0,696	0,026
3,120	0,765	0,029
6,250	0,923	0,036
12,500	1,121	0,044
25,000	1,457	0,058
50,000	1,662	0,067
100,000	1,977	0,080

[0038] Dieser Werte werden dann verwendet, um die Wirksamkeiten von bekannten Mengen von neuen BMP-Formulierungen mit bekannten wirksamen BMP-Formulierungen zu vergleichen.

C. Osteocalcin RIA-Protokoll

[0039] W-20 Zellen werden bei 106 Zellen pro Mulde in multimulden Gewebekulturschalen mit 24 Mulden in 2 ml DME platziert, welches 10% durch Hitze inaktiviertes fötales Kalbserum, 2 mM Glutamin enthielt. Die Zellen dürfen über Nacht in einer Atmosphäre von 95% Luft, 5% CO_2 bei 37°C anhaften.
[0040] Am nächsten Tag wird das Medium zu DME gewechselt, welches 10% fötales Kalbserum, 2 mM Glutamin und die Testsubstanz in einem Gesamtvolumen von 2 ml enthielt. Jede Testsubstanz wird an dreifache Mulden verabreicht. Die Testsubstanzen werden mit den W-20 Zellen für ingesamt 96 Stunden mit Ersatz bei 48 Stunden durch die gleichen Testmedien inkubiert.
[0041] Am Ende von 96 Stunden werden 50 µl des Testmedium aus jeder Mulde entfernt und unter Verwendung eines Radioimmuntests für Maus-Osteocalcin auf Osteocalcin-Produktion getestet. Die Details des Tests werden in dem durch Biomedical Technologies Inc., 378 Page Street, Stroughton, MA 02072 hergestellten Kit beschrieben. Reagenzien für den Test werden als Produktnummern BT-431 (Maus-Osteocalcin-Standard), BT-432 (Ziege-Anti-Maus-Osteocalcin), BT-431R (iodiniertes Maus-Osteocalcin), BT-415 (normales Ziegenserum) und BT-414 (Esel-Anti-Ziege IgG) gefunden. Der RIA für durch W-20 Zellen in Respons auf BMP-Behandlung synthetisiertes Osteocalcin wird wie im durch den Hersteller vorgesehenen Protokoll beschrieben durchgeführt.

Patentansprüche

1. Zusammensetzung, umfassend ein osteogenes Protein, etwa 0,1 bis etwa 5,0% (w/v) eines Zuckers, etwa 1,0 bis etwa 10,0% (w/v) Glycin und etwa 1 bis etwa 20 mM Glutaminsäurehydrochlorid, wobei die Formulierung einen pH-Wert von etwa 4,5 hat.

2. Zusammensetzung nach Anspruch 1, weiterhin umfassend etwa 0,01 bis etwa 0,1% (w/v) eines nicht-ionischen Tensids.

3. Zusammensetzung, umfassend ein osteogenes Protein, etwa 1 bis etwa 10% (w/v) Glycin, etwa 0,1 bis etwa 5,0% (w/v) Saccharose, etwa 0,01 bis etwa 0,1% (w/v) eines nicht-ionischen Tensids und etwa 5 bis etwa 10 mM Glutaminsäurehydrochiorid, wobei die Formulierung einen pH-Wert von weniger als etwa 6,0 hat.

4. Zusammensetzung, umfassend ein osteogenes Protein, etwa 2,5% (w/v) Glycin, etwa 0,5% (w/v) Saccharose, etwa 5 mM Glutaminsäurehydrochlorid, und etwa 0,01% (w/v) Polysorbat 80, wobei die Formulierung

einen pH-Wert von etwa 4,5 hat.

5. Zusammensetzung, umfassend eine lyophilisierte Formulierung von etwa 3,12% bis etwa 24,38% (w/w) morphogenes Knochenprotein (BMP); etwa 0,52% bis etwa 10,27% (w/w) Glutaminsäurehydrochlorid; etwa 38,4% bis etwa 75,7% (w/w) Glycin; etwa 14,28% bis etwa 47,15% (w/w) Saccharose; und gegebenenfalls etwa 0,15% bis etwa 2,94% (w/w) Polysorbat 80.

6. Zusammensetzung nach Anspruch 5, wobei die Formulierung relative Gewichtsmengen von etwa 4,0 mg/ml BMP-2; etwa 0,918 mg/ml Glutaminsäurehydrochlorid; etwa 25 mg/ml Glycin; etwa 5 mg/ml Saccharose; und gegebenenfalls etwa 0,1 mg/ml Polysorbat 80 umfasst.

7. Zusammensetzung nach Anspruch 5, wobei die Formulierung relative Gewichtsmengen von etwa 2,0 mg/ml BMP-2; etwa 0,918 mg/ml Glutaminsäurehydrochlorid; etwa 25 mg/ml Glycin; etwa 5 mg/ml Saccharose; und gegebenenfalls etwa 0,1 mg/ml Polysorbat 80 umfasst.

Es folgt kein Blatt Zeichnungen