



(19)
Bundesrepublik Deutschland
Deutsches Patent- und Markenamt

(10) DE 697 23 845 T2 2004.06.03

(12)

Übersetzung der europäischen Patentschrift

(97) EP 0 910 400 B1

(21) Deutsches Aktenzeichen: 697 23 845.8

(86) PCT-Aktenzeichen: PCT/US97/07655

(96) Europäisches Aktenzeichen: 97 923 567.8

(87) PCT-Veröffentlichungs-Nr.: WO 97/041880

(86) PCT-Anmeldetag: 06.05.1997

(87) Veröffentlichungstag

der PCT-Anmeldung: 13.11.1997

(97) Erstveröffentlichung durch das EPA: 28.04.1999

(97) Veröffentlichungstag

der Patenterteilung beim EPA: 30.07.2003

(47) Veröffentlichungstag im Patentblatt: 03.06.2004

(51) Int Cl.⁷: A61K 38/18

A61P 13/12

(30) Unionspriorität:

643321 06.05.1996 US

(84) Benannte Vertragsstaaten:

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

(73) Patentinhaber:

Curis, Inc., Cambridge, Mass., US

(72) Erfinder:

SAMPATH, T., Kuber, Medway, US; COHEN, M., Charles, Weston, US

(74) Vertreter:

Patentanwälte Wallach, Koch & Partner, 80339
München

(54) Bezeichnung: THERAPIEN DES CHRONISCHEN NIERENVERSAGENS

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 eingereicht, 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

Gebiet der Erfindung

[0001] Die vorliegende Erfindung betrifft die Verwendung bestimmter Proteine der osteogenetischen Proteine/Knochen-morphogenetischen Proteinfamilie innerhalb der TGF- β -Superfamilie von Proteinen zur Herstellung von Medikamenten für die Prophylaxe oder Behandlung des chronischen Nierenversagens bei einem Säugetier.

Hintergrund der Erfindung

[0002] Das Säugetier-Nieren- bzw. -Renal-System spielt primäre Rollen sowohl in der Entfernung kataboler Abfallprodukte aus dem Blutstrom als auch in der Aufrechterhaltung der Flüssigkeits- und Elektrolyt-Gleichgewichte im Körper. Nierenversagen ist deswegen ein lebensbedrohlicher Zustand, bei dem die Bildung von Kataboliten und deren Toxinen und/oder die Entwicklung signifikanter Ungleichgewichte bei den Elektrolyten oder Flüssigkeiten zum Versagen anderer großer Organsysteme und zum Tod führen kann. Allgemein wird das Nierenversagen in „akut“ oder „chronisch“ eingeteilt. Wie unten ausführlich dargestellt, ist das chronische Nierenversagen eine entkräftende und lebensbedrohliche Erkrankung, für die keine adäquate Behandlung existiert.

Chronisches Nierenversagen

[0003] Das chronische Nierenversagen kann als progressive, permanente und signifikante Reduktion der glomerulären Filtrationsrate (GFR) aufgrund eines signifikanten und fortschreitenden Verlustes von Nephronen definiert werden. Das chronische Nierenversagen beginnt typischerweise an einem Punkt, an dem eine chronische Niereninsuffizienz (d. h. eine permanente Abnahme der Nierenfunktion von zumindest 50–60%) sich aus einem Insult des Nierengewebes ergeben hat, der einen signifikanten Verlust an Nephron-Einheiten verursacht hat. Der initiale Insult kann oder kann nicht mit einer Episode eines akuten Nierenversagens in Verbindung gestanden haben. Unabhängig von der Art des anfänglichen Insults manifestiert ein chronisches Nierenversagen einen „finalen gemeinsamen Weg“ von Zeichen und Symptomen, wenn die Nephronen fortschreitend verlorengehen und die GFR fortschreitend abnimmt. Diese progressive Zerstörung der Nierenfunktion erfolgt langsam, umspannt typischerweise viele Jahre oder Jahrzehnte bei menschlichen Patienten, ist jedoch anscheinend nicht abwendbar.

[0004] Das frühe Stadium eines chronischen Nierenversagens beginnt typischerweise, wenn die GFR sich auf ungefähr ein Drittel des Normalwertes reduziert hat (beispielsweise 30–40 ml/Min. für einen durchschnittlichen humanen Erwachsenen). Als Folge des signifikanten Nephron-Verlustes und in einem offensichtlichen „Versuch“, die Gesamt-GFR mit weniger Nephronen aufrechtzuerhalten, wird die durchschnittliche einzelne Nephron-GFR (SNGFR) durch Adaptionen der verbleibenden Nephronen sowohl auf der strukturellen als auch funktionellen Ebene erhöht. Eine strukturelle Manifestation dieser Adaption, die durch mikroskopische Überprüfung von Biopsie-Proben leicht nachweisbar ist, ist eine „kompensatorische Hypertrophie“ sowohl der Glomeruli als auch der Tubuli der Niere, ein Prozess, der in wörtlichem Sinne das Filtratvolumen erhöht, das durch den verbleibenden Nephron durch im wörtlichen Sinne Vergrößerung der Glomeruli und Tubuli produziert wird. Tatsächlich enthält der Urin von Patienten mit einem chronischen Nierenversagen als Folge der Hypertrophie oder Dilatation der Sammelgefäße oftmals breite „(Harn)zylinder“ bzw. „casts“, die typischerweise zwei bis sechs Mal den normalen Durchmesser aufweisen, was die Diagnose unterstützt und die ebenfalls als „Nierenversagen-Harnzylinder“ bezeichnet werden. Zur selben Zeit existieren funktionelle Veränderungen in den verbleibenden Nephronen, wie beispielsweise eine gesenkten Absorption und eine erhöhte Sekretion normalerweise ausgeschiedener gelöster Stoffe, die Reaktionen auf hormonelle oder parakrine Veränderungen anderswo im Körper sein können (beispielsweise zunehmende Konzentrationen an Parathyroid-Hormon (PTH) in Reaktion auf Veränderungen der Serumkonzentrationen von Kalzium und Phosphat).

[0005] Diese Adaptionen in einem frühen Stadium des chronischen Nierenversagens sind bei der vollständigen Wiederherstellung des GFR oder anderer Parameter der Nierenfunktion nicht erfolgreich und tatsächlich unterliegen die verbleibenden Nephronen einem erhöhten Verlustrisiko. Beispielsweise ist die erhöhte SNGFR mit mechanischen Belastungen des Glomerulus aufgrund der Hypertension und Hyperperfusion verbunden. Der Verlust der Unversehrtheit der Podozyten-Bindungsstellen führt zu einer erhöhten Permeabilität des Glomerulus gegenüber Makromolekülen oder einer „Leckage“ der glomerulären Kapsel. Proliferative Effekte werden ebenfalls in Mesangial-, Epithel- und Endothel-Zellen beobachtet, ebenso wie Zunahmen der Ablagerung von Kollagen und anderer Matrixproteine. Eine Sklerose sowohl der Glomeruli als auch der Tubuli ist ein weiteres übliches Symptom hypertrophierter Nephrome und das Risiko einer Koagulation im Glomerulus nimmt zu. Insbesondere diese Adaptionen der verbleibenden Nephrome senken tatsächlich durch Drücken des SNGFR stark außerhalb seines normalen Niveaus die Kapazität der verbleibenden Nephronen, so dass sie auf akute

Veränderungen der Wasser-, gelösten Stoff- oder Säurebelastungen reagieren und erhöhen dadurch tatsächlich die Wahrscheinlichkeit eines zusätzlichen Nephron-Verlustes.

[0006] Wenn ein chronisches Nierenversagen fortschreitet, fährt die Abnahme des GFRs auf weniger als 10% des Normalen (beispielsweise 5–10 ml/Min.) fort, das Subjekt bzw. der Patient tritt in das Endstadium der Nierenerkrankung ein (ESRD). Während dieser Phase führt das Unvermögen der verbleibenden Nephronen bzw. Nephrons, Abfallprodukte in adäquater Weise aus dem Blut zu entfernen, während nützliche Produkte zurückgehalten werden und die Flüssigkeits- und Elektrolytgleichgewichte aufrechterhalten bleiben, zu einer schnellen Abnahme, bei der viele Organsysteme, und insbesondere das kardiovaskuläre System, zu versagen beginnen. Es kann beispielsweise erwartet werden, dass BUN- und Kreatinin-Konzentrationen ansteigen und, bei BUN-Konzentrationen von 60–100 mg/dl und Serumkreatinin-Konzentrationen von 8–12 mg/dl entwickelt sich typischerweise ein urämisches Syndrom, bei dem die Nieren nicht mehr länger die Endprodukte des Stickstoff-Stoffwechsels entfernen können. An diesem Punkt nimmt das Nierenversagen rasch bis hin zum Tod zu, bis der Patient eine Nierenersatztherapie empfängt (d. h. chronische Hämodialyse, kontinuierliche Peritonealdialyse oder Nierentransplantation).

[0007] Ungefähr 600 Patienten pro Million empfangen jedes Jahr in den Vereinigten Staaten eine chronische Dialyse bei durchschnittlichen Kosten von ungefähr 60.000 bis 80.000 Dollar pro Patient pro Jahr. Von den Neufällen des Endstadiums einer Nierenerkrankung jedes Jahres sind ungefähr 28–33% auf eine diabetische Nephropathie (oder diabetische Glomerulopathie oder diabetische renale Hypertrophie), 24–29% auf eine hypertensive Nephrosklerose (oder hypertensive Glomerulosklerose) und 15–22% auf eine Glomerulonephritis zurückzuführen.

[0008] Die 5-Jahres-Überlebensrate für alle chronischen Dialysepatienten liegt ungefähr bei 40%, jedoch nimmt die Rate für Patienten über 65 auf ungefähr 20% ab.

[0009] Es verbleibt deswegen ein Bedarf nach Behandlungen, die den progressiven Verlust der Nierenfunktion, der verursacht, dass fast 200.000 Patienten allein in den USA von der chronischen Dialyse abhängig werden und der den frühzeitigen Tod von Zehntausenden pro Jahr mit sich bringt, vermieden wird.

Zusammenfassung der Erfindung

[0010] Die vorliegende Erfindung betrifft die Verwendung pharmazeutischer Zubereitungen zur Herstellung von Medikamenten zur Behandlung von Säugetier-Patienten bei einem chronischen Nierenversagen oder die einem Risiko hier von, oder einem Risiko des Bedarfs einer Nierenersatztherapie unterliegen. Solche Patienten schließen Patienten ein, die bereits von einem chronischen Nierenversagen befallen sind oder die bereits eine Nierenersatztherapie empfangen haben, ebenso wie jedes Subjekt, von dem man vernünftigerweise erwarten kann, dass es unter einem progressiven Verlust der Nierenfunktion, die mit einem progressiven Verlust von funktionierenden Nephron-Einheiten verbunden sind, leidet. Ob das spezielle Subjekt einem Risiko unterliegt, ist eine Bestimmung, die routinemäßig vom Fachmann auf dem Gebiet der relevanten medizinischen oder veterinarmedizinischen Wissenschaft durchgeführt werden kann. Subjekte mit einem chronischen Nierenversagen oder die einem Risiko unterliegen, eine renale Ersatztherapie zu benötigen, schließen ein, sind jedoch nicht beschränkt auf, die folgenden: Subjekte, die als durch ein chronisches Nierenversagen, Nierenerkrankung im Endstadium, chronische diabetische Nephropathie, hypertensive Nephrosklerose, chronische Glomerulonephritis, angeborene Nephritis und/oder renale Dysplasie befallen sind; Subjekte, die eine Biopsie aufweisen, die auf eine glomeruläre Hypertrophie, tubuläre Hypertrophie, chronische Glomerulosklerose und/oder chronische tubulointerstitielle Sklerose hinweist; Subjekte, die eine Ultraschall-, MRI-, CAT-Scan- oder andere nicht-invasive Überprüfung vorliegen haben, die auf eine Nierenfibrose hinweist; Subjekte, die eine unübliche Anzahl von breiten Harnzylin dern, die im Harnsediment vorliegen, aufweisen; Subjekte mit einer GFR, die chronisch weniger als ungefähr 50%, und insbesondere weniger als ungefähr 40%, 30% oder 20% des erwarteten GFRs für das Subjekt beträgt; humane männliche Subjekte, die weniger als ungefähr 50 kg wiegen und die eine GFR aufweisen, die chronisch weniger als ungefähr 50 ml/Min. ist und insbesondere weniger als ungefähr 40 ml/Min., 30 ml/Min. oder 20 ml/Min. beträgt; humane weibliche Subjekte, die weniger als ungefähr 40 kg wiegen und eine GFR aufweisen, die chronisch weniger als ungefähr 40 ml/Min. und insbesondere weniger als ungefähr 30 ml/Min., 20 ml/Min. oder 10 ml/Min. beträgt; Subjekte, die eine Anzahl funktioneller Nephron-Einheiten besitzen, die weniger als ungefähr 50% und insbesondere weniger als ungefähr 40%, 30% oder 20% der Anzahl funktioneller Nephron-Einheiten besitzen, die ein gesundes, ansonsten jedoch in anderer Weise ähnliches Subjekt besitzt; Subjekte, die eine einzige Niere aufweisen; und Subjekte, die Nierentransplantat-Empfänger sind.

[0011] Die Verwendungen dieser Erfindung profitieren teilweise von der Entdeckung, dass bestimmte Proteine eukaryontischen Ursprungs, hierin als renale therapeutische Mittel definiert, und die Mitglieder bzw. Elemente der osteogenetischen Protein/knochenmorphogenetischen Protein (OPBMP)-Familie von Proteinen einschließen, bei der Behandlung von Subjekten verwendet werden können, die wie hierin definiert, dem Risiko eines chronischen Nierenversagens oder dem Bedarf nach einer Nierenersatztherapie unterliegen. Nützli-

che renale therapeutische Mittel schließen Polypeptide oder funktionelle Varianten von Polypeptiden ein, die zumindest die C-terminale 6- oder 7-Cystein-Domäne eines Säugetierproteins umfassen, ausgewählt aus der Gruppe, die aus OP-1, OP-2, OP-3, BMP2, BMP3, BMP4, BMP5, BMP6, BMP9 und Proteinen besteht, die zumindest 70%, besonders bevorzugt 75 oder 80% Aminosäuresequenzhomologie mit der Aminosäuresequenz der 7-Cystein-Domäne von humanem OP-1 zeigen; und die (a) dazu in der Lage sind, die Knorpelbildung bzw. Chondrogenese im Reddi-Sampath-ektopischen Knochenassay (Sampath und Reddi (1981), Proc. Natl. Acad. Sci. (USA) 78: 7599–7603) der in einem im Wesentlichen äquivalenten Assay zu induzieren, (b) die dazu in der Lage sind, den progressiven Verlust der Nierenfunktion in einem Standard-Tiermodell des chronischen Nierenversagens signifikant zu vermeiden, zu hemmen, zu verzögern oder zu lindern, oder (c) die dazu in der Lage sind, eine klinisch signifikante Verbesserung bei einem Standardmarker der Nierenfunktion zu verursachen, wenn es einem Säugetier mit einem chronischen Nierenversagen verabreicht wird oder einem Säugetier, das einem solchen Risiko ausgesetzt ist.

[0012] Die renalen therapeutischen Mittel der Erfindung können durch irgendeinen Verabreichungsweg verabreicht werden, der mit dem ausgewählten Mittel vereinbar ist, und können mit irgendeinem pharmazeutisch verträglichen Träger formuliert werden, der für den Verabreichungsweg geeignet ist. Bevorzugte Verabreichungswege sind parenteral und insbesondere intravenöse, intraperitoneale und renale intrakapsuläre Verabreichung. Die Behandlungen werden ebenfalls vorzugsweise über eine verlängerte Zeitspanne auf einer ambulanten Basis durchgeführt. Tägliche Dosierungen der renalen therapeutischen Mittel liegen erwarteterweise in einem Bereich von 0,01–1.000 µg/kg Körpergewicht und besonders bevorzugt ungefähr 10–300 µg/kg Körpergewicht, obwohl präzise Dosierungen abhängig vom speziellen verwendeten renalen therapeutischen Mittel und dem speziellen medizinischen Zustand des Patienten und dessen Krankheitsgeschichte variieren.

[0013] Die Anwendungen der vorliegenden Erfindung sind bei der Vorbeugung, Hemmung oder Verzögerung des progressiven Fortschreitens des Verlustes von funktionellen Nephron-Einheiten und dem folgenden progressiven Verlust der Nierenfunktion, von Nutzen, die das chronische Nierenversagen verkörpern bzw. versinnbildlichen. Als solches sind sie beim Vermeiden oder Verzögern des Bedarfs nach einer chronischen Dialyse oder Nierenersatztherapie bei Subjekten mit einer chronischen Niereninsuffizienz oder bei: m Reduzieren der notwendigen Häufigkeit der chronischen Nierendialyse bei Subjekten mit einer Nierenerkrankung im Endstadium von großem Wert. Sie sind als solches bei der Verlängerung des Lebens von Nutzen und bei der Aufrechterhaltung der Lebensqualität von Subjekten, die von einem chronischen Nierenversagen bereits befallen sind oder einem Risiko dahingehend ausgesetzt sind.

Kurze Beschreibung der Figuren

[0014] **Fig. 1** Diese Figur ist ein Balkendiagramm, das die durchschnittlichen Serumkreatinin-Konzentrationen für die Gruppen von scheinoperierten („SHAM“) oder teilweise nephrektomisierten („Nx Contr“ und „OP-1“) Ratten darstellt. 5–6 Monate nach dem chirurgischen Eingriff empfingen die Ratten Injektionen lediglich von Träger („Nx Kontrolle“ und „SHAM“) oder 1, 3, 10 oder 50 µg/kg Körpergewicht lösliches OP-1 („OP-1“) dreimal pro Woche für 4–8 Wochen.

[0015] **Fig. 2** Diese Figur ist ein Balkendiagramm, das die durchschnittlichen Serumharnstoff-Konzentrationen für Gruppen von scheinoperierten („SHAM“) oder teilweise nephrektomisierten („Nx Contr“ und „OP-1“) Ratten darstellt. 5–6 Monate nach dem chirurgischen Eingriff empfingen die Ratten Injektionen nur von Trägerstoff („Nx Kontrolle“ und „SHAM“) oder 1, 3, 10 oder 50 µg/kg Körpergewicht lösliches OP-1 („OP-1“) dreimal pro Woche für 4–8 Wochen.

[0016] **Fig. 3** Felder A und B dieser Figur sind Mikrophotographien von Nierengewebe von Ratten bei einer 10-fachen Vergrößerung. (A) Gewebe von einer Ratte bei chronischem Nierenversagen nach einer 5/6 Nephrektomie (Nx Kontrolle). (B) Gewebe von einer Ratte, die mit OP-1 nach einer 5/6 Nephrektomie behandelt wurde.

[0017] **Fig. 4** Felder A und B dieser Figur sind Mikrophotographien von Nierengewebe von Ratten bei 40-facher Vergrößerung. (A) Gewebe von einer Ratte bei chronischem Nierenversagen nach 5/6 Nephrektomie (Nx Kontrolle). (B) Gewebe von einer Ratte, die mit OP-1 nach einer 5/6 Nephrektomie behandelt wurde.

[0018] **Fig. 5** Diese Figur ist eine Liniendarstellung, die die durchschnittlichen Serumkreatinin-Konzentrationen über 9 Wochen hinweg für Gruppen von teilweise nephrektomisierten Ratten darstellt. 2–3 Wochen nach dem chirurgischen Eingriff empfingen die Ratten Injektionen lediglich Träger („Kontrolle“) oder 10 µg/kg Körpergewicht lösliches OP-1 („OP-1“) dreimal pro Woche.

[0019] **Fig. 6** Diese Figur ist eine Liniendarstellung, die die durchschnittliche Kreatinin-Clearance-Raten darstellt, als eine Messung der GFR über 8 Wochen für Gruppen von teilweise nephrektomisierten Ratten. 2–3 Wochen nach dem chirurgischen Eingriff empfingen die Ratten Injektionen von lediglich Träger („Kontrolle“) oder von 10 µg/kg Körpergewicht löslichem OP-1 („OP-1“) dreimal pro Woche.

I. Definitionen

[0020] Um den Gegenstand der beanspruchten Erfindung klarer und präziser darzustellen, werden die nachfolgenden Definitionen für spezielle Begriffe bereitgestellt, die in der nachfolgenden schriftlichen Beschreibung und den hierzu beigefügten Ansprüchen verwendet werden.

[0021] Renales therapeutisches Mittel. Wie hierin verwendet, bedeutet der Begriff „renales therapeutisches Mittel“ ein Polypeptid oder eine funktionelle Variante eines Polypeptids, die zumindest die C-terminale 6- oder 7-Cystein-Domäne eines Säugetierproteins umfasst, ausgewählt aus der Gruppe, die aus OP-1, OP-2, OP-3, BMP2, BMP3, BMP4, BMP5, BMP6, BMP9 und Proteinen besteht, die zumindest 70% oder besonders bevorzugt 75% oder 80% Aminosäuresequenzhomologie mit der Aminosäuresequenz der 7-Cystein-Domäne von humanem OP-1 zeigt; und das (a) zum Induzieren der Knorpelbildung im ektopischen Reddi-Sampath-Knochenassay (Sampath und Reddi (1981), Proc. Natl. Acad. Sci. (USA) 78: 7599– 7603) oder in einem im Wesentlichen äquivalenten Assay in der Lage ist, (b) das dazu in der Lage ist, den progressiven Verlust der Nierenfunktion in einem Standard-Tiermodell des chronischen Nierenversagens zu vermeiden, zu hemmen, zu verzögern oder zu lindern, oder (c) das dazu in der Lage ist, eine klinisch signifikante Verbesserung eines Standardmarkers der Nierenfunktion zu verursachen, wenn es einem Säugetier bei chronischem Nierenversagen oder bei Risiko eines chronischen Nierenversagens verabreicht wird. Wie hierin verwendet, zeigt eine prozentuale "Homologie" zwischen zwei Aminosäuresequenzen den Prozentsatz der Aminosäurereste an, die zwischen den Sequenzen identisch oder ähnlich sind, und, wie hierin verwendet, sind „ähnliche“ Reste, „konervative Substitutionen“, die die Kriterien für eine „akzeptierte Punktmutation“ in Dayhoff et al. (1978), Atlas of Protein Sequence and Structure Bd. 5 (Ergänzungsband 3), Seiten 354–352, Natl. Biomed. Res. Found., Washington. D. C., erfüllen.

[0022] Therapeutische Wirksamkeit. Wie hierin verwendet, hat ein renales therapeutisches Mittel der Erfindung „therapeutische Wirksamkeit“ und eine Menge des Mittels ist „therapeutisch effektiv“ bzw. „therapeutisch wirksam“, wenn die Verabreichung der Menge des Mittels ausreichend ist, um eine klinisch signifikante Verbesserung eines Standardmarkers der Nierenfunktion zu verursachen, wenn er einem Säugetier-Subjekt (beispielsweise humanem Patient) verabreicht wird, das unter einem chronischen Nierenversagen leidet oder diesem Risiko unterliegt. Solche Marker der Nierenfunktion sind in der medizinischen Literatur wohl bekannt und schließen ohne darauf eingeschränkt sein zu wollen die Raten der Zunahme der BUN-Konzentrationen, die Raten der Zunahme des Serumkreatinins, statische Messungen des BUN, statische Messungen von Serumkreatinin, glomeruläre Filtrationsraten (GFR), die Verhältnisse von BUN/Kreatinin, Serumkonzentrationen von Natrium (Na⁺), Urin/Plasma-Verhältnisse für Kreatinin, Urin/Plasma-Verhältnisse für Urea bzw. Harnstoff, Urin-Osmolalität, täglicher Urin-Output und dergleichen ein (siehe beispielsweise Brenner und Lazarus (1994), in Harrison's Principles of Internal Medicine, 13. Ausgabe, Isselbacher et al., Hsg., Mc. Graw Hill Text, New York; Luke und Strom (1994), in Internal Medicine, 4. Ausgabe, J. H. Stein, Hsg., Mosby-Year Book, Inc. St. Louis).

[0023] Glomeruläre Filtrationsrate (GFR). Die „glomeruläre Filtrationsrate“ oder „GFR“ ist der Clearance-Rate einer durch Plasma übertragenen Substanz proportional, die nicht an Serum-Proteine gebunden ist, wird frei durch die Glomeruli hindurch filtriert und wird weder durch die Nierentubuli sezerniert noch reabsorbiert. Somit ist, wie hierin verwendet, die GFR vorzugsweise durch die nachfolgende Gleichung definiert:

$$GFR = \frac{U_{\text{conc}} \times V}{P_{\text{conc}}}$$

[0024] Wobei U_{conc} die Urinkonzentration des Markers ist, wobei P_{conc} die Plasmakonzentration des Markers ist und wobei V die Urinströmungsgeschwindigkeit in ml/Min. ist. Wahlweise ist die GFR bezüglich der Körperoberfläche korrigiert. Somit können die hierin verwendeten GFR-Werte als Einheiten von ml/Min./1,73 m² betrachtet werden.

[0025] Das bevorzugte Maß der GFR ist die Inulin-Clearance, jedoch wird die Clearance von Kreatinin wegen der Schwierigkeit, die Konzentrationen dieser Substanz zu messen, typischerweise in klinischen Einrichtungen verwendet. Beispielsweise wird angenommen, dass eine typische GFR für einen gesunden Mann durchschnittlicher Größe (70 kg, 20–40 Jahre), gemessen durch die Kreatinin-Clearance, ungefähr 125 ml/Min. mit Plasma-Kreatinin-Konzentrationen von 0,7–1,5 mg/dl ist. Für eine vergleichbar große durchschnittliche Frau wird erwartet, dass eine typische GFR, die durch Kreatinin-Clearance gemessen wird, ungefähr 115 ml/Min. mit Kreatinin-Konzentrationen von 0,5–1,3 mg/dl ist. Während der Zeit der guten Gesundheit sind die humanen GFR-Werte bis zu einem Alter von ungefähr 40 relativ stabil, wenn die GFR typischerweise mit dem Alter abzusinken beginnt. Für Subjekte, die bis zu einem Alter von 85 oder 90 Jahren überleben, wird die GFR auf 50% der vergleichbaren Werte in einem Alter von 40 reduziert.

[0026] Erwartete glomeruläre Filtrationsrate (GFR_{exp}). Eine Schätzung der „erwarteten GFR“ oder GFR_{exp} kann auf Grundlage von Erwägungen des Alters, Gewichtes, Geschlechtes, der Körperoberfläche und dem Muskulaturgrad und der Plasmakonzentration einer bestimmten Markerverbindung (beispielsweise Kreatinin), wie bestimmt durch einen Bluttest, bereitgestellt werden. Somit kann als Beispiel ein erwarteter GFR oder GFR_{exp} wie folgt geschätzt werden.

$$GFR_{exp} = \frac{(140 - Alter) \times \text{Gewicht (kg)}}{72 \times P_{conc}(\text{mg/dl})}$$

[0027] Diese Schätzung berücksichtigt Faktoren wie Oberfläche, Muskulaturgrad oder prozentuales Körperfett nicht. Nichtsdestoweniger wurde unter Verwendung der Plasmakreatinin-Konzentrationen als Marker diese Formel für Männer als preiswertes Mittel zur Einschätzung der GFR verwendet. Weil Kreatinin durch quergestreifte unwillkürliche Muskeln produziert wird, wird die erwartete GFR oder GFR_{exp} von Frauen durch dieselbe Gleichung multipliziert mit 0,85 geschätzt, um den erwarteten Unterschieden der Muskelmasse Rechnung zu tragen (siehe Lemann et al. (1990), Am. J. Kidney Dis. 16 (3): 236–243).

[0028] Breiter Harnzylinder. Eine mikroskopische Überprüfung des Harnsediments auf das Vorhandensein gebildeter Elemente ist ein Standardverfahren in der Urinanalyse. Unter den gebildeten Elementen, die im Urin vorliegen können, befinden sich zylindrische Massen aus agglutinierten Materialien, die typischerweise eine Gussform oder „Zylinder“ des Lumens eines distalen gebogenen Tubulus oder Sammeltubulus repräsentieren. Bei gesunden humanen Subjekten weisen solche Zylinder typischerweise einen Durchmesser von 15–25 µm auf. Bei Subjekten mit chronischem Nierenversagen jedoch kann eine Hypertrophie der Tubuli das Vorhandensein von „breiten Zylindern“ oder „Nierenversagens-Zylindern“ zur Folge haben, die zwei- bis sechsmal den Durchmesser von normalen Zylindern aufweisen und oftmals eine homogene wachsartige Erscheinung aufweisen. Somit bedeutet, wie hierin verwendet, ein „breiter Zylinder“ einen Harnsediment-Zylinder mit einem Durchmesser von zwei- bis sechsmal des normalen, oder ungefähr 30 bis 150 µm für humane Zylinder.

[0029] Chronisch. Wie hierin bezüglich der klinischen Indikationen wie beispielsweise Urin-Zylinder, gemessener GFR oder anderen Markern der Nierenfunktion verwendet, bedeutet „chronisch“ für eine Zeitspanne von zumindest drei und besonders bevorzugt zumindest sechs Monate persistierend. Somit ist beispielsweise ein Subjekt mit einer gemessenen GFR, die chronisch unter 50% GFR_{exp} liegt, ein Subjekt, in dem die GFR gemessen wurde und unter 50% der GFR_{exp} in zumindest zwei Messungen gefunden wurde, getrennt durch zumindest drei und besonders bevorzugt zumindest sechs Monate und für die kein medizinisch korrekter Grund existiert anzunehmen, dass die GFR während der dazwischenliegenden Periode beträchtlich (beispielsweise 10%) höher war.

[0030] Subjekte bei chronischem Nierenversagen bzw dem Risiko hiervon. Wie hierin verwendet, leidet ein Subjekt an einem chronischen Nierenversagen oder unterliegt dem Risiko hiervon oder einem Risiko für eine Nierenersatztherapie (d. h. chronische Hämodialyse, kontinuierliche Peritonealdialyse oder Nierentransplantation), falls vernünftigerweise angenommen werden kann, dass das Subjekt unter einem progressiven Verlust der Nierenfunktion leidet, der mit einem progressiven Verlust funktionierender Nephron-Einheiten in Verbindung steht. Ob ein spezielles Subjekt unter einem chronischen Nierenversagen leidet oder einem Risiko hiervon unterliegt, ist eine Bestimmung, die routinemäßig durch den Fachmann auf dem relevanten medizinischen oder veterinärmedizinischen Gebiet durchgeführt werden kann. Subjekte, die einem chronischen Nierenversagen bzw. einem Risiko hiervon oder einem Risiko des Bedarfs nach einer Nierenersatztherapie unterliegen, schließen ein, sind jedoch nicht beschränkt auf Folgendes Subjekte, die als an einem chronischen Nierenversagen, einer Nierenerkrankung im Endstadium, einer chronischen diabetischen Nephropathie, einer hypertensiven Nephrosklerose, einer chronischen Glomerulonephritis, einer angeborenen Nephritis und/oder einer renalen Dysplasie befallen angesehen werden können; Objekte, die eine Biopsie aufweisen, die auf eine glomeruläre Hypertrophie, tubuläre Hypertrophie, chronische Glomervlosklerose und/oder chronische tubuloinstittuelle Sklerose hinweist; Subjekte mit einer Ultraschall-, MRI-CAT-Scan oder anderen nicht-invasiven Überprüfung, die auf eine Nierenfibrose hinweist; Subjekte mit einer unüblichen Anzahl von breiten Zylindern, die im Harnsediment vorliegen; Subjekte mit einer GFR, die chronisch geringer als ungefähr 50 ist und besonders bevorzugt weniger als ungefähr 40%, 30% oder 20% der erwarteten GFR für das Subjekt ist; humane männliche Subjekte, die zumindest ungefähr 50 kg wiegen und eine GFR aufweisen, die chronisch weniger als ungefähr 50 ml/Min. beträgt und insbesondere weniger als ungefähr 40 ml/Min., 30 ml/Min. oder 20 ml/Min. beträgt; humane weibliche Subjekte, die zumindest ungefähr 40 kg wiegen und eine GFR aufweisen, die chronisch weniger als ungefähr 40 ml/Min. und besonders bevorzugt weniger als ungefähr 30 ml/Min., 20 ml/Min. oder 10 ml/Min. beträgt; Subjekte, die eine Anzahl von funktionellen Nephron-Einheiten aufweisen, die weniger als ungefähr 50% und insbesondere weniger als ungefähr 40%, 30% oder 20% der Anzahl an funktionellen Nephron-Einheiten ist, die von einem gesunden, ansonsten jedoch ähnlichen Subjekt besessen werden; Subjekte, die eine einzige Niere aufweisen; und Subjekte, die Nierentransplantations-Empfänger sind.

II. Beschreibung der bevorzugten Ausführungsformen

A. Allgemeines

[0031] Die vorliegende Erfindung hängt teilweise von der überraschenden Entdeckung ab, dass die Verabreichung bestimmter Protein-basierter renaler therapeutischer Mittel an Subjekte mit chronischem Nierenversagen oder die einem Risiko hiervon unterliegen, die Mortalität und/oder Morbiditätsraten reduzieren und den progressiven Verlust der Nierenfunktion hemmen, vorbeugen, verzögern oder lindern können, der das chronische Nierenversagen charakterisiert. Alternativ oder zusätzlich kann die Verabreichung der renalen therapeutischen Mittel der vorliegenden Erfindung den fortschreitenden Verlust funktioneller Nephron-Einheiten und die progressive Abnahme der glomerulären Filtrationsrate (GFR), die langsam, jedoch unausweichlich zum Bedarf nach einer Nierenersatztherapie führt (d. h. Nierentransplantat oder chronische Dialyse) oder die zum Tod führt, vermeiden, hemmen oder verzögern. In bevorzugten Ausführungsformen sind die therapeutischen Mittel der Erfindung Elemente der Familie des osteogenetischen Proteins/knochenmorphogenetischen Proteins (OP/BMP) innerhalb der TGF- β -Superfamilie von Proteinen.

B. Renale therapeutische Mittel

[0032] Die renalen therapeutischen Mittel der vorliegenden Erfindung sind natürlich vorkommende Proteine oder funktionelle Varianten natürlich vorkommender Proteine in der osteogenetischen Protein/Knochen-morphogenetischen Protein (OPBMP)-Familie innerhalb der TGF- β -Superfamilie von Proteinen. Das heißt, diese Proteine bilden eine getrennte Untergruppe, die hierin als die „OPBMP-Familie“ bezeichnet wird, innerhalb der lockeren evolutionären Gruppierung sequenzverwandter Proteine, die als die TGF- β -Superfamilie bekannt ist. Mitglieder dieser Proteinfamilie umfassen sezernierte Polypeptide, die gemeinsame strukturelle Merkmale teilen und die in ähnlicher Weise von einem Pro-Protein zur Gewinnung eines reifen carboxyterminalen Proteins prozessiert bzw. verarbeitet werden. Innerhalb des reifen Proteins teilen alle Mitglieder ein konserviertes Muster von sechs oder sieben Cystein-Resten, die eine 97–106 Aminosäure-Domäne definieren, und die aktive Form dieser Proteine ist entweder ein Disulfid-verbrücktes Homodimer eines einzigen Familienmitgliedes oder ein Heterodimer zweier unterschiedlicher Mitglieder (siehe beispielsweise Massague (1990), *Ann. Rev. Cell Biol.* 6: 597; Sampath et al. (1990), *J. Biol. Chem.* 265: 13198). Beispielsweise ist humanes OP-1 aus natürlicher Quelle in seiner reifen nativen Form ein glykosyliertes Dimer, das typischerweise ein apparentes bzw. scheinbares Molekulgewicht bzw. relative Molekulmasse von ungefähr 30–36 kDa aufweist, wie dies durch SDS-PAGE bestimmt wurde. Wenn es reduziert wird, lässt das 30-kDa-Protein zwei glykosylierte Peptid-Untereinheiten mit scheinbaren Molekulargewichten von ungefähr 16 kDa und 18 kDa entstehen. Das unglykosulierte Protein weist ein apparentes Molekulargewicht von ungefähr 27 kDa auf. Wenn es reduziert ist, lässt das 27-kDa-Protein zwei unglykosylierte Polypeptid-Ketten entstehen, mit Molekulargewichten von ungefähr 14 kDa bis 16 kDa.

[0033] Die natürlich vorkommenden OP/BMP-Proteine werden als Vorläufer translatiert, die eine n-terminale Signalpeptidsequenz, eine „Pro“-Domäne und eine „reife“ Proteindomäne aufweisen. Das Signalpeptid ist typischerweise weniger als 30 Reste lang und wird rasch nach Translation an einer Spaltstelle gespalten, die unter Verwendung des Verfahrens von Von Heijne (1986), *Nucleic Acids Research* 14: 4683–4691, vorhergesagt werden kann. Die „Pro“-Domäne ist sowohl bezüglich der Sequenz als auch der Länge variabel und erstreckt sich ungefähr über 200 bis über 400 Reste. Die Pro-Domäne wird abgespalten, so dass sich die „reife“ C-terminale Domäne von ungefähr 115 bis 180 Resten ergibt, die die konservierte 6- oder 7-Cystein C-terminale Domäne von 97–106 Resten einschließt. Wie hierin verwendet, betrifft die „Proform“ eines Mitgliedes der OP/BMP-Familie ein Protein, das zwei gefaltete Polypeptide umfasst, die jeweils eine Pro-Domäne entweder in kovalenter oder nicht-kovalenter Verbindung mit den reifen Domänen des OPBMP-Polypeptids umfasst. Typischerweise ist unter physiologischen Bedingungen die Proform des Proteins löslicher als die reife Form. Die Proform scheint die primäre von kultivierten Säugetierzellen sezernierte Form zu sein. Die „reife Form“ des Proteins betrifft eine C-terminale Domäne, die mit der Pro-Domäne nicht verbunden ist, weder kovalent noch nicht-kovalent. Jede Zubereitung aus OP-1 wird als die reife Form enthaltend betrachtet, wenn die Menge an Pro-Domäne in der Zubereitung nicht mehr als 5% der Menge der „reifen“ C-terminalen Domäne beträgt.

[0034] Die Mitglieder der OP/BMP-Familie, die hierin von Nutzen sind, schließen irgendeines der bekannten natürlich vorkommenden nativen Proteine ein, einschließlich Allel-, phylogenetischer Gegenstück- oder anderer Varianten hiervon, gleichgültig, ob aus natürlicher Quelle oder biosynthetisch produziert (beispielsweise einschließlich von „Muteinen“ oder „mutierten Proteinen“), ebenso wie neue, aktive Mitglieder der OP/BMP-Proteinfamilie.

[0035] Besonders nützliche Sequenzen schließen solche ein, die die C-terminalen 7-Cystein-Domänen von Säugetier- vorzugsweise humanem, OP-1, OP-2, OP-3, BMP2, BMP3, BMP4, BMP5, BMP6, BMP8 und BMP9 einschließen. Weitere Proteine, die in der Ausübung der Erfindung von Nutzen sind, schließen aktive bzw. wirk-

same Formen von GDF-5, GDF-6, GDF-7, DPP, Vg1, Vgr-1, 60A, GDF-1, GDF-3, GDF-5, GDF-6, GDF-7, BMP10, BMP11, BMP13, BMP15, UNIVIN, NODAL, SCREW, ADMP oder NURAL und Aminosäuresequenz-Varianten hiervon. Bei einer gegenwärtig bevorzugten Ausführungsform sind die renalen therapeutischen Mittel der Erfindung aus irgendeinem des Folgenden ausgewählt: OP-1, OP-2, OP-3, BMP2, BMP3, BMP4, BMP5, BMP6 und BMP9.

[0036] Publikationen, die diese Sequenzen offenbaren, ebenso wie deren chemische und physikalische Eigenschaften, schließen Folgendes ein: OP-1 und OP-2: US-Patent Nr. 5 01: 691, US-Patent Nr. 5 266 683 und Ozkaynak et al. (1990), EMBO J. 9: 2085–2093, OP-3: WO94/10203, BMP2, BMP3 und BMP4: US-Patent Nr. 5 013 649, WO91/18098, WO88/00205 und Wozney et al. (1988), Science 242: 1528–1534; BMP5 und BMP6: WO90/11366 und Celeste et al. (1991), Proc. Natl. Acad. Sci. (USA) 87: 9843–9847; Vgr-1: Lyons et al. (1989), Proc. Natl. Acad. Sci. (USA) 86: 4554–4558; DPP: Padgett et al. (1987), Nature 325: 81–84; Vgl: Weeks (1987), Cell 51: 861–867; BMP9: WO95/33830; BMP10: WO94/26893; BMP11: WO94/26892; BMP12: WO95/16035; BMP13: WO95/16035; GDF-1: WO92/00382 und Lee et al. (1991), Proc. Natl. Acad. Sci. (USA) 88: 4250–4254; GDF-8: WO94/21681; GDF-9: WO94/15966; GDF-10: WO95/10539; GDF-11: WO96/01845; BMP15: WO96/36710; MP121: WO96/01316; GDF-5: CDMP-1, MP52): WO94/15949, WO96/14335, WO93/1609 und Storm et al. (1994), Nature 386: 639–643; und GDF-6 (CDMP-2, BMP13): WO95/01801, WO96/14335 und WO95/10635; GDF-7 (CDMP-3, BMP12): WO95/10802 und WO95/10635; BMP3b: Takao et al. (1996), Biochem. Biophys. Res. Comm. 219: 656–662; GDF-3: WO91/15965; 60A: Blaster et al. (1993), Cell 73: 687–702 und GenBank-Zugangsnummer L 12032. Bei einer weiteren Ausführungsform schließe nützliche Proteine biologisch aktive biosynthetische Konstrukte, einschließlich neuer biosynthetischer Proteine und chimärer Proteine ein, die unter Verwendung von Sequenzen aus zwei oder mehreren bekannten OPBMP-Familienproteinen entwickelt wurden. Siehe ebenfalls die in US-Patent Nr. 5 011 691 offenbarten biosynthetischen Konstrukte, deren Offenbarung durch diese Bezugnahme hierin mit aufgenommen ist (beispielsweise COP-1, COP-3, COP-4, COP-5, COP-7 und COP-16).

[0037] Bei weiteren bevorzugten Ausführungsformen schließen die hierin nützlichen renalen therapeutischen Mittel therapeutisch wirksame Proteine ein, bei denen die Aminosäuresequenzen eine Sequenz umfassen, die zumindest 70% Aminosäuresequenz- "Homologie" und vorzugsweise 75 oder 80% Homologie mit der C-terminalen 7-Cystein-Domäne teilt, die in den aktiven Formen von humanem OP-1 vorliegt (d. h. Reste 330–431, wie in SEQ ID Nr. 2 von US-Patent Nr. 5 266 683 dargestellt ist). Bei weiteren bevorzugten Ausführungsformen schließen die hierin nützlichen renalen therapeutischen Mittel therapeutisch wirksame Proteine ein, bei denen die Aminosäuresequenzen eine Sequenz umfassen, die zumindest 60% Aminosäuresequenzidentität und vorzugsweise 65 oder 70% Identität mit der C-terminalen 7-Cystein-Domäne teilen, die in den aktiven Formen von humanem OP-1 vorliegt. Somit kann eine Kandidaten-Aminosäuresequenz, von der angenommen wird, dass sie eine therapeutische Wirksamkeit in der vorliegenden Erfindung aufweist, mit der Aminosäuresequenz der C-terminalen 6-Cystein-Domäne von humanem OP-1 unter Verwendung des Verfahrens von Needleman et al. (1970), J. Mol. Biol. 48: 443–453 aligned werden, bequemerweise durch Computerprogramme wie das Align-Programm (DNAstar, Inc.) implementiert. Wie es für den Fachmann auf dem Gebiet erkennbar sein wird, schließen homologe oder funktionell äquivalente Sequenzen funktionell äquivalente Anordnungen der Cystein-Reste innerhalb des konservierten Cystein-Skeletts ein, einschließlich von Aminosäure-Insertionen oder -Deletionen, die die lineare Anordnung dieser Cysteine einschließt, die jedoch materiell ihre Beziehung in der gefalteten Struktur des dimeren Proteins nicht beeinträchtigt, einschließlich ihres Vermögens, Intra- oder Intercetten-Disulfid-Brücken zu bilden, wie es für eine biologische Aktivität notwendig sein mag. Deswegen werden interne Lücken und Aminosäure-Insertionen in der Kandidatensequenz für die Zwecke der Berechnung des Niveaus der Aminosäuresequenz-Homologie oder -Identität zwischen der Kandidaten- und der Referenzsequenz ignoriert.

[0038] „Aminosäuresequenz-Homologie“ wird hierin so verstanden, dass sowohl eine Aminosäuresequenz-Identität als auch -Ähnlichkeit mit eingeschlossen ist. Somit zeigt, wie hierin verwendet, eine prozentuale "Homologie" zwischen zwei Aminosäuresequenzen den Prozentsatz der Aminosäurereste an, die zwischen den Sequenzen identisch oder ähnlich sind. „Ähnliche“ Reste sind „konservative Substitutionen“, die die für eine „akzeptierte Punktmutation“ in Dayhoff et al. (1978) definierten Kriterien erfüllen, Atlas of Protein Sequence and Structure, Bd. 5, Ergänzungsband 3, Seiten 354–352, Natl. Biomed. Res. Found., Washington D. C. Somit sind „konservative Substitutionen“ Reste, die den entsprechenden Referenzresten physikalisch oder funktionell ähnlich sind, ähnliche Größe, Form, elektrische Ladung und/oder chemische Eigenschaften, wie beispielsweise das Vermögen aufweisen, kovalente oder Wasserstoff-Brückenbindungen oder dergleichen zu bilden. Beispiele für konservative Substitutionen schließen die Substitution einer Aminosäure für eine andere mit ähnlichen Charakteristika ein, beispielsweise Substitutionen mit den folgenden Gruppen: (a) Valin, Glycin; (b) Glycin, Alanin; (c) Valin, Isoleucin, Leucin; (d) Asparaginsäure, Glutaminsäure; (e) Asparagin, Glutamin; (f) Serin, Threonin; (g) Lysin, Arginin, Methionin; und (h) Phenylalanin, Tyrosin. Der Begriff „konservative Substitution“ oder „konservative Variation“ schließt ebenfalls die Verwendung einer substituierten Aminosäure anstelle einer unsubstituierten Stamm-Aminosäure in einer gegebenen Polypeptid-Kette ein, vorausgesetzt, dass die

sich ergebende substituierte Polypeptid-Kette ebenfalls in der vorliegenden Erfindung eine therapeutische Wirksamkeit aufweist.

[0039] Die renalen therapeutischen Mittel der Erfindung werden ebenfalls durch biologische Aktivitäten charakterisiert, die einfach vom Fachmann auf dem Gebiet sichergestellt werden können. Insbesondere ist ein renales therapeutisches Mittel der vorliegenden Erfindung (a) dazu in der Lage, eine Knorpelbildung im Reddi-Sampath-ektopischen Knochenassay (Sampath und Reddi (1981), Proc. Natl. Acad. Sci. (USA), 78: 7599–7603) oder bei einem im Wesentlichen äquivalenten Assay zu induzieren, (b) dazu in der Lage, den fortschreitenden Verlust der Nierenfunktion in einem Standard-Tiermodell des chronischen Nierenversagens signifikant zu vermeiden, zu hemmen, zu verzögern oder zu lindern, oder (c) dazu in der Lage, eine klinisch signifikante Verbesserung bezüglich eines Standardmarkers der Nierenfunktion zu verursachen, wenn es einem Säugetier bei chronischem Nierenversagen oder das dem Risiko eines chronischen Nierenversagens unterliegt, verabreicht wird.

[0040] Der ektopische Knochenassay von Reddi-Sampath ist in der Technik als ein Assay für die chondrogenetische Aktivität wohl bekannt. Der Assay, der einfach durchgeführt werden kann, wird beispielsweise in Sampath und Reddi (1981), Proc. Natl. Acad. Sci. (USA) 78: 7599–7603; und Wozney (1989), „Bone Morphogenetic Proteins“, Progress in Growth Factor Research 1: 267–280, beschrieben und diskutiert. Viele äquivalente Assays unter Verwendung anderer Tiere und Gewebsstellen können verwendet und vom Fachmann auf dem Gebiet entwickelt werden, um die biologische Aktivität der renalen therapeutischen Mittel der vorliegenden Erfindung zu evaluieren. Siehe beispielsweise die im US-Patent Nr. 5 226 683 beschriebenen Bioassays.

[0041] Die renalen therapeutischen Mittel der vorliegenden Erfindung können ebenfalls in den Tiermodellen des chronischen Nierenversagens getestet werden. Säugetiermodelle des chronischen Nierenversagens beispielsweise bei Mäusen, Ratten, Meerschweinchen, Katzen, Hunden, Schafen, Ziegen, Schweinen, Kühen, Pferden und nicht-humanen Primaten können erzeugt werden, indem eine geeignete direkte oder indirekte Verletzung oder ein Insult von Nierengewebe des Tieres verursacht wird. Tiermodelle des chronischen Nierenversagens können beispielsweise durch Durchführen einer Teil- (beispielsweise 5/6) Nephrektomie erzeugt werden, die die Anzahl funktionierender Nephron-Einheiten auf ein Niveau reduziert, das eine kompensatorische renale Hypertrophie, einen weiteren Nephron-Verlust und die fortschreitende Abnahme der Nierenfunktion initiiert, die das chronische Nierenversagen charakterisiert.

[0042] Zuletzt können die renalen therapeutischen Mittel der vorliegenden Erfindung auf ihre therapeutische Wirksamkeit bei der Verursachung einer klinisch signifikanten Verbesserung eines Standardmarkers der Nierenfunktion evaluiert werden, wenn sie einem Säugetier-Subjekt verabreicht werden (beispielsweise einem menschlichen Patient, der unter einem chronischen Nierenversagen leidet oder dem Risiko hiervon ausgesetzt ist). Solche Marker der Nierenfunktion sind in der medizinischen Literatur wohl bekannt und schließen ohne Einschränkung die Raten der Zunahme der BUN-Konzentrationen, die Raten der Zunahme des Serum-Kreatinins, statische Messungen von BUN, statische Messungen von Serum-Kreatinin, die glomerulären Filtrationsraten (GFR), die Raten von BUN-Kreatinin, die Serumkonzentrationen von Natrium (Na⁺), Urin/Plasma-Verhältnisse für Kreatinin, Urin/Plasma-Verhältnisse für Urea, Urinosmolalität, täglicher Urin-Output und dergleichen ein (siehe beispielsweise Brenner und Lazarus (1994) in Harrison's Principles of Internal Medicine, 13. Ausgabe, Isselbacher et al., Hsg., Mc. Graw Hill Text, New York; Luke und Strom, (1994) in Internal Medicine, 4. Ausgabe, J. H. Stein, Hsg. Mosby-Year Book, Inc. S. Louis).

[0043] Die renalen therapeutischen Mittel, die hierin betrachtet werden, können aus intakter oder trunkierter genetischer oder cDNA oder aus synthetischen DNAs in prokaryontischen oder eukaryontischen Wirtszellen exprimiert werden. Die dimeren Proteine können aus den Kulturmedien isoliert und/oder umgefaltet und in vitro dimerisiert werden, so dass sie biologisch aktive Zusammensetzungen bilden. Heterodimere können in vitro gebildet werden, indem getrennte, voneinander verschiedene Polypeptid-Ketten kombiniert werden. Alternativ können Heterodimere in einer einzelnen Zelle durch Koexprimieren von Nukleinsäuren gebildet werden, die getrennte, voneinander verschiedene Polypeptid-Ketten codieren. Siehe; beispielsweise WO93/09229 oder US-Patent Nr. 5 411 941 für mehrere beispielhafte rekombinante heterodimere Proteinproduktions-Vorschriften. Gegenwärtig bevorzugte Wirtszellen schließen ohne Beschränkung Prokaryonten, einschließlich E. coli oder Eukaryonten, einschließlich Hefe, Saccharomyces, Insektenzellen oder Säugetierzellen, wie beispielsweise CHO-, COS- oder BSC-Zellen ein. Der Fachmann auf dem Gebiet wird erkennen, dass andere Wirtszellen ebenfalls vorteilhaft verwendet werden können. Ausführliche Beschreibungen der Proteine, die in der Ausübung dieser Erfindung von Nutzen sind, einschließlich wie diese herzustellen, zu verwenden und auf eine chondrogenetische Aktivität zu testen sind, sind in zahlreichen Publikationen veröffentlicht, einschließlich US-Patent-Nr. 5 266 683 und 5 011 691, deren Offenbarungen durch Bezugnahme hierin mit aufgenommen sind.

C. Subjekte zur Behandlung

[0044] Allgemein können die Verfahren der vorliegende Erfindung für jedes Säugetier-Subjekt verwendet wer-

den, das einem chronischen Nierenversagen ausgesetzt ist oder diesem Risiken oder einem Risiko des Bedarfs für eine Nierenersatztherapie unterliegt (d. h. chronische Dialyse oder Nierentransplantation). Säugetier-Subjekte, die gemäß der Verfahren der Erfindung behandelt werden können, schließen ein, sind jedoch nicht beschränkt auf, humane Subjekte oder Patienten. Zusätzlich kann die Erfindung jedoch in der Behandlung domestizierter Tiere verwendet werden, die als Begleiter des Menschen gehalten werden (beispielsweise Hunde, Katzen, Pferde), die einen bedeutenden kommerziellen Wert aufweisen (beispielsweise Milchkühe, Fleischvieh, Sporttiere), die einen signifikanten wissenschaftlichen Wert aufweisen (beispielsweise gefangene oder freie Exemplare gefährdeter Arten) oder die in anderer Weise einen Wert aufweisen. Zusätzlich brauchen als allgemeiner Belang die Subjekte zur Behandlung mit den Verfahren der vorliegenden Erfindung keine anderen Indikationen zur Behandlung mit den renalen therapeutischen Mitteln der Erfindung als solche aufweisen, die mit dem Risiko eines chronischen Nierenversagens in Verbindung stehen. Das heißt, es wird erwartet, dass die Subjekte zur Behandlung in anderer Weise frei von Anzeichen für eine Behandlung mit den renalen therapeutischen Mitteln der vorliegenden Erfindung sind. In einigen Fällen jedoch können die Subjekte andere Symptome aufweisen (beispielsweise Osteodystrophie), für die eine Behandlung mit den Mitteln der vorliegenden Erfindung angezeigt wäre. In solchen Fällen sollte die Behandlung demgemäß eingestellt werden, so dass eine exzessive Dosierung vermieden wird.

[0045] Der Fachmann auf dem Gebiet der Medizin und Veterinärmedizin ist darin trainiert, Subjekte zu erkennen, die einem beträchtlichen Risiko eines chronischen Nierenversagens ausgesetzt sind oder einem beträchtlichen Risiko des Bedarfs für eine Nierenersatztherapie. Es wird insbesondere angenommen, dass klinische und nicht-klinische Versuche ebenso wie akkumulierte Erfahrung bezüglich der gegenwärtig offenbarten und anderer Verfahren der Behandlung den befähigten Praktiker bei der Entscheidung informieren werden, ob ein gegebenes Subjekt ein chronisches Nierenversagen aufweist und einem entsprechenden Risiko oder dem Risiko des Bedarfs einer Nierenersatztherapie unterliegt und ob irgendeine spezielle Behandlung, die für die Bedürfnisse des Subjekts am besten geeignet ist, einschließlich einer Behandlung gemäß der vorliegenden Erfindung.

[0046] Allgemein kann ein Säugetier-Subjekt als einem chronischen Nierenversagen unterliegend bzw. einem Risiko hiervon ausgesetzt betrachtet werden oder einem Risiko des Bedarfs einer Nierenersatztherapie, wenn das Subjekt bereits als von einem Zustand, der typischerweise zum progressiven Verlust einer Nierenfunktion, der mit einem progressiven Verlust funktionierender Nephron-Einheiten verbunden ist, führt oder als durch einen solchen befallen angesehen wird. Solche Zustände bzw. Bedingungen schließen ein, sind jedoch nicht beschränkt auf, chronisches Nierenversagen, Nierenkrankheit im Endstadium, chronische diabetische Nephropathie, hypertensive Nephrosklerose, chronische Glomerulonephritis, angeborene Nephritis, renale Dysplasie und dergleichen. Diese und andere Krankheiten und Zustände, die in der Technik bekannt sind, führen typischerweise zu einem progressiven Verlust funktionierender Nephrons und zum Ausbruch eines chronischen Nierenversagens.

[0047] Häufig mag ein Fachmann auf dem Gebiet der medizinischen oder veterinärmedizinischen Wissenschaft eine Prognose, Diagnose oder Behandlungsentscheidung auf die Überprüfung einer Nierenbiopsie-Probe stützen. Solche Biopsien stellen eine Fülle von Informationen bereit, die bei der Diagnose von Störungen der Niere von Nutzen sind, jedoch mag dies nicht für alle Subjekte geeignet sein aufgrund der Invasivität des Verfahrens und der zusätzlichen Verletzung einer vermeintlich ungesunden Niere. Nichtsdestoweniger können Subjekte, die unter einem chronischen Nierenversagen leiden oder einem dementsprechenden Risiko unterliegen oder einem Risiko des Bedarfs nach einer Nierenersatztherapie, durch histologische Anzeichen aus Nierenbiopsien erkannt werden, einschließlich, jedoch nicht beschränkt auf, glomeruläre Hypertrophie, tubuläre Hypertrophie, Glomerulosklerose, tubulointerstitielle Sklerose und dergleichen.

[0048] Weniger invasive Techniken zur Feststellung der Nieren-Morphologie schließen MRI, CAT und Ultraschall-Scans ein. Scan-Techniken sind ebenfalls verfügbar, die Kontrast-gebende oder Bild-gebende Mittel verwenden (beispielsweise radioaktive Farbstoffe, es sollte jedoch erwähnt werden, dass einige von diesen besonders für das Nierengewebe und -strukturen toxisch sind und deswegen mag ihre Verwendung bei Subjekten, die einem chronischen Nierenversagen unterliegen oder einem Risiko hiervon ausgesetzt sind, nicht angezeigt sein, Solche nicht-invasiven Scan-Techniken können dazu verwendet werden, um Zustände, beispielsweise eine Nierenfibrose oder -sklerose, fokale renale Nekrose, Renalzysten bzw. Nierenzysten und grobe bzw. makroskopische Nierenhypertrophie nachzuweisen, die ein Subjekt einem chronischen Nierenversagen oder dem Risiko hiervon aussetzen oder dem Risiko des Bedarfs nach einer Nierenersatztherapie.

[0049] Sehr häufig basieren Prognose, Diagnose und/oder Behandlungs-Entscheidungen auf klinischen Indikationen der Nierenfunktion. Eine solche Indikation ist das Vorliegen von Harnsediment einer unüblichen Anzahl von „breiten“ oder „Nierenversagen“-Zylindern, die für eine tubuläre Hypertrophie indiziert sind und die kompensatorische Nierenhypertrophie nahelegt, die ein chronisches Nierenversagen typifiziert. Eine bessere Indikation der Nierenfunktion ist die glomeruläre Filtrationsrate (GFR), die direkt durch Quantifizieren der Rate der Clearance spezieller Marker gemessen werden kann, oder die aus indirekten Messungen gefolgt werden kann.

[0050] Es sollte erwähnt werden, dass die vorliegende Erfindung nicht auf die Messung der GFR oder auf die Diagnose eines chronischen Nierenversagens gerichtet ist. Die Verfahren der Behandlung der vorliegenden Erfindung müssen deswegen auf Subjekte beschränkt sein, die irgendwelche speziellen Maße bzw. Maßzahlen der GFR zeigen oder irgendwelche anderen spezielle Marken der Nierenfunktion. Es ist tatsächlich nicht notwendig, dass die GFR eines Subjektes oder irgendein anderer spezieller Marker der Nierenfunktion bestimmt wird, bevor die Behandlungen der vorliegenden Erfindung durchgeführt werden. Es wird nichtsdestoweniger angenommen, dass die Messung der GFR ein bevorzugtes Mittel zur Feststellung der Nierenfunktion ist.

[0051] Wie in der Technik wohl bekannt ist, spiegelt die GFR die Rate bzw. Geschwindigkeit der Clearance einer Referenz- oder Markerverbindung aus dem Plasma in den Urin wider. Die zu betrachtende Markerverbindung ist typischerweise eine, die durch die Glomeruli frei filtriert wird, die jedoch nicht durch die Nieren-Tubuli aktiv sezerniert und reabsorbiert wird und die nicht signifikant durch zirkulierende Proteine gebunden ist. Die Rate der Clearance ist typischerweise durch die oben präsentierte Formel definiert, die das Volumen von Urin betrifft, der in einer 24-stündigen Zeitspanne erzeugt wird, und die relativen Konzentrationen des Markers im Urin und im Plasma. Um genauer zu sein, sollte die GFR auch bezüglich der Körperoberfläche korrigiert werden. Die „Goldstandard“-Referenzverbindung ist Inulin wegen ihrer Filtrationseigenschaften und dem Fehlen einer Serumbindung. Die Konzentration dieser Verbindung ist jedoch im Blut oder Urin schwer zu quantifizieren. Die Clearance-Geschwindigkeiten anderer Verbindungen, einschließlich p-Aminohippurat (PAH) und Kreatinin werden deswegen oftmals anstelle von Inulin verwendet. Zusätzlich werden oftmals verschiedene Formeln verwendet, die die Einschätzung der tatsächlichen GFR durch Vermeidung von Erwägungen der tatsächlichen Urinkonzentrationen des Markers, der tatsächlichen täglichen Volumina des erzeugten Urins und der tatsächlichen Körperoberfläche zu vereinfachen suchen. Diese Werte können durch Schätzungen basierend auf anderen Faktoren ersetzt werden, durch Baseline-Werte, die vom derselben Subjekt stammen oder durch Standardwerte für ähnliche Subjekte. Diese Schätzungen sollten jedoch mit Vorsicht verwendet werden, weil sie ungeeignete Einschätzungen der Nierenfunktion normaler gesunder Subjekte mit einschließen können.

[0052] Verschiedene Verfahren und Formeln wurden in der Technik entwickelt, die einen erwarteten Wert für eine GFR für ein gesundes Subjekt mit bestimmten Eigenschaften beschreiben.

[0053] Insbesondere sind Formeln verfügbar, die einen erwarteten Wert der GFR auf Grundlage der Plasmakreatinin-Konzentrationen des Alters, des Gewichtes und des Geschlechts bereitstellen. Eine solche Formel für eine erwartete GFR ist oben dargestellt. Weitere Formeln können natürlich verwendet werden und Tabellen mit Standardwerten können für Subjekte eines vorgegebenen Alters, Gewichtes, Geschlechts und/oder Plasmakreatinin-Konzentration erzeugt werden. Neuere Verfahren der Messung oder Einschätzung der GFR (beispielsweise unter Verwendung von NMR- oder MRI-Technologien) sind nunmehr ebenfalls in der Technik verfügbar und können gemäß der vorliegenden Erfindung verwendet werden (siehe beispielsweise US-Patent Nr. 5 100 646 und 5 335 660).

[0054] Allgemein kann ein Subjekt, unabhängig von der Art und Weise, in der die GFR gemessen oder eingeschätzt wird, als einem chronischen Nierenversagen unterliegend oder einem Risiko hiervon oder einem Risiko des Bedarfs einer Nierenersatztherapie ausgesetzt betrachtet werden, wenn das Subjekt eine GFR aufweist, die chronisch weniger als ungefähr 50% der erwarteten GFR für das Subjekt beträgt. Es wird angenommen, dass das Risiko größer ist, wenn die GFR weiter sinkt. Somit wird ein Subjekt zunehmend einem Risiko ausgesetzt angesehen, wenn das Subjekt eine GFR aufweist, die chronisch weniger als ungefähr 40%, 30% oder 20% der erwarteten GFR beträgt.

[0055] Als allgemeine Angelegenheit kann ein humanes männliches Subjekt, unabhängig von der Art und Weise, in der die GFR gemessen oder geschätzt wird, das zumindest ungefähr 50 kg wiegt, als einem chronischen Nierenversagen ausgesetzt oder einem Risiko des Bedarfs einer Nierenersatztherapie, wenn das Subjekt eine GFR aufweist, die chronisch weniger als ungefähr 50 ml/Min. beträgt. Das Risiko wird als größer betrachtet, wenn die GFR weiter abfällt. Somit wird ein Subjekt zunehmend als einem Risiko ausgesetzt betrachtet, wenn das Subjekt eine GFR aufweist, die chronisch weniger als ungefähr 40, 30 oder 20 ml/Min. beträgt.

[0056] Als allgemeine Angelegenheit kann ein humanes weibliches Subjekt, das weniger als zumindest ungefähr 40 kg wiegt, unabhängig von der Art und Weise, in der die GFR gemessen oder eingeschätzt wird, einem chronischen Nierenversagen ausgesetzt oder einem Risiko hiervon unterliegend oder dem Risiko eines Bedarfs einer Nierenersatztherapie unterliegend angesehen werden, wenn das Subjekt eine GFR aufweist, die chronisch weniger als ungefähr 40 ml/Min. beträgt. Dieses Risiko wird als größer angesehen, wenn die GFR abfällt. Somit wird ein Subjekt als einem zunehmenden Risiko ausgesetzt betrachtet, wenn das Subjekt eine GFR aufweist, die chronisch weniger als ungefähr 30, 20 oder 10 ml/Min. beträgt.

[0057] Durch Verwendung einer Vielzahl von Verfahren, einschließlich der histologischen Überprüfungen, nicht invasiver Scan-Verfahren, Evaluationen klinischer Indikatoren und anderer Techniken, die oben beschrieben und in der Technik bekannt sind, kann der Fachmann auf dem Gebiet der Medizin und Veterinärmedizin Einschätzungen entweder der Anzahl funktionierender Nephron-Einheiten, die ein Subjekt besitzt, oder den

Prozentsatz von funktionierenden Nephron-Einheiten einschätzen, die ein Subjekt bezüglich eines gesunden jedoch ansonsten ähnlichen Subjektes besitzt (beispielsweise eines Artgenossen-Subjektes ungefähr desselben Alters, Gewichtes und Geschlechtes). Somit kann eine Biopsie beispielsweise eine Abnahme der Dichte funktioneller Nephrons ans Licht bringen oder eine Bildgebung mit filtrierten Mitteln kann einen Verlust funktionellen Nierengewebes und/oder der Filterkapazität anzeigen. Solche Messungen oder Schätzungen stellen ein weiteres Mittel des Ausdrucks dar, ob ein Subjekt einem chronischen Nierenversagen ausgesetzt ist oder einem Risiko hiervon unterliegt oder einem Risiko des Bedarfs einer Nierenersatztherapie. Somit kann als allgemeine Angelegenheit ein Subjekt einem chronischen Nierenversagen oder dem Risiko hiervon ausgesetzt oder dem Risiko des Bedarfs einer Nierenersatztherapie ausgesetzt sein, wenn das Subjekt eine Anzahl funktioneller Nephron-Einheiten besitzt, die weniger als ungefähr 50% der Anzahl funktioneller Nephron-Einheiten in einem gesunden, jedoch ansonsten ähnlichen Subjekt, besitzt. Wie oben angezeigt, wird das Risiko als größer betrachtet, wenn die Anzahl funktioneller Nephrons weiter abnimmt. Somit wird ein Subjekt als einem Risiko ausgesetzt betrachtet, wenn das Subjekt eine Anzahl funktioneller Nephrons aufweist, die weniger als ungefähr 40, 30 oder 20% der Anzahl für ein ähnliches, jedoch gesundes Subjekt beträgt.

[0058] Es sollte zuletzt erwähnt werden, dass Subjekte, die eine einzige Niere besitzen, unabhängig von der Art und Weise des Verlustes der anderen Niere (beispielsweise physische Verletzung, chirurgische Entfernung, Geburtsdefekt), als prima facie dem Risiko eines chronischen Nierenversagens oder dem Bedarf für eine Nierenersatztherapie ausgesetzt betrachtet werden können. Dies ist insbesondere bei Subjekten der Fall, bei denen eine Niere aufgrund einer Erkrankung oder eines Zustands bzw. Leidens verlorengegangen ist, der die verbleibende Niere heimsuchen kann. In ähnlicher Weise können Subjekte, die bereits Empfänger eines Nierentransplantats sind oder die bereits eine chronische Dialyse empfangen (beispielsweise eine chronische Hämodialyse oder kontinuierliche ambulante Peritonealdialyse) einem Prima-facie-Risiko eines chronischen Nierenversagens oder dem Bedarf für eine weitere Nierenersatztherapie ausgesetzt betrachtet werden.

D. Formulierungen und Verfahren der Behandlung

[0059] Die nierentherapeutischen Mittel der vorliegenden Erfindung können auf jedem Weg verabreicht werden, der mit dem speziell verwendeten renalen therapeutischen Mittel kompatibel ist. Somit kann die Verabreichung wie geeignet oral oder parenteral, einschließlich intravenös, intraperitoneal und auf renalen intrakapsulären Verabreichungswegen erfolgen. Zusätzlich kann die Verabreichung durch periodische Injektionen eines Bolus des renalen therapeutischen Mittels erfolgen oder kann kontinuierlicher durch intravenöse und intraperitoneale Verabreichung aus einem Behälter durchgeführt werden, der extern (beispielsweise ein i. v.-Beutel) oder intern vorliegt (beispielsweise ein bioerodierbares Implantat oder eine implantierte Pumpe).

[0060] Die renalen therapeutischen Mittel der Erfindung können einem Individuum durch geeignete Mittel, vorzugsweise direkt (beispielsweise lokal wie durch Injektion oder topische Verabreichungen an einen Gewebsort) oder systemisch (beispielsweise parenteral oder oral verabreicht werden. Wenn das Mittel parenteral bereitgestellt werden soll, wie beispielsweise intravenös, subkutan oder intramuskulär, ist das Mittel vorzugsweise Teil einer wässrigen Lösung. Die Lösung ist physiologisch verträglich, so dass zusätzlich zur Abgabe des erwünschten Mittels an das Subjekt die Lösung in anderer Weise das Elektrolyt- und/oder Volumen-Gleichgewicht bzw. -Haushalt des Subjektes nicht nachteilig beeinflusst. Das wässrige Medium für das Mittel kann somit normale bzw. physiologische Salzlösung (beispielsweise 9,85% NaCl, 0,15 M, pH 7–7,4) umfassen.

[0061] Falls erwünscht, kann ein gegebenes renales therapeutisches Mittel oder ein anderes Mittel durch Verbindung mit einem geeigneten Molekül löslicher gemacht werden. Beispielsweise hat eine Verbindung eines reifen OPBMP-Dimers mit einer OPBMP-Prodomäne die Pro-Form des renalen therapeutischen Mittels zur Folge, das typischerweise löslicher oder in physiologischen Lösungen dispergierbarer ist als die entsprechende reife Form. Es wird tatsächlich angenommen, dass die endogenen Mitglieder der OPBMP-Familie im Säugetierkörper in dieser Form transportiert (beispielsweise sezerniert und zirkuliert) werden. Diese lösliche Form des Proteins kann aus Kulturmedium OP/BMP-sezernierender Säugetierzellen gewonnen werden, beispielsweise Zellen, die mit einer Nukleinsäure transfiziert sind, die das Protein codiert und kompetent ist, um diese zu exprimieren. Alternativ kann eine lösliche Spezies durch Komplexieren des reifen Dimers und eines aktiven Fragmentes hiervon mit einer Prodomäne oder einem Löslichkeits-erhöhenden Fragments hiervon (unten vollständiger beschrieben) formuliert werden. Ein weiteres Molekül, das zur Steigerung der Löslichkeit in der Lage ist und das insbesondere für orale Verabreichungen von Nutzen ist, ist Kasein. Beispielsweise erhöht der Zussatz von 0,2 Kasein die Löslichkeit der reifen aktiven Form von OP-1 um 80%. Weitere Bestandteile, die in der Milch und/oder verschiedenen Serumproteinen zu finden sind, können ebenfalls verwendet werden.

[0062] Nützliche Lösungen zur parenteralen Verabreichung können durch irgendeines der in der pharmazeutischen Technik wohl bekannten Verfahren hergestellt werden, die beispielsweise in Remington's Pharmaceutical Sciences (Gennaro, A., Hsg.), Mack Pub., 1990, beschrieben sind.

[0063] Alternativ können die hierin beschriebenen Mittel oral verabreicht werden. Eine orale Verabreichung von Proteinen als Therapeutika wird im Allgemeinen nicht praktiziert, weil die meisten Proteine durch Verdau-

ungsenzyme und -säuren im Säugetierverdauungssystem leicht abgebaut werden, bevor sie in den Blutstrom absorbiert werden. Jedoch sind die renalen therapeutischen Mittel, die hierin beschrieben sind, typischerweise Säure-stabil und Protease-resistant (siehe beispielsweise US-Patent Nr. 4 968 590). Zusätzlich wurde zumindest eines dieser renalen therapeutischen Mittel, nämlich OP-1, in Brustdrüsensextrakt, Colostrum und 57-Tage-Milch identifiziert. Überdies ist OP-1, das aus Brustdrüsensextrakt aufgereinigt ist, therapeutisch wirksam und wird ebenfalls im Blutstrom nachgewiesen. Zuletzt ist die lösliche Form von OP-1, beispielsweise reifes OP-1, das mit der Pro-Domäne verbunden ist, therapeutisch wirksam. Diese Erkenntnisse, ebenso wie solche, die in den Beispielen nachstehend offenbart sind, zeigen, dass die orale und parenterale Verabreichung brauchbare Mittel zur Verabreichung der renalen therapeutischen Mittel der vorliegenden Erfindung an ein Individuum sind. Zusätzlich ist die Form, die in der Milch (und Brustdrüsensextrakt und Colostrum) gefunden wird, leicht löslich, wohingegen die reifen Formen bestimmter renaler therapeutischer Mittel, die hierin beschrieben sind, typischerweise schlecht löslich sind, vielleicht durch Verbindung mit der reifen, therapeutisch wirksamen Form mit einem Teil oder der gesamten Pro-Domäne der intakten Sequenz und/oder durch Verbindung mit einem oder mehreren Milchbestandteilen. Demgemäß können die hierin bereitgestellten Verbindungen mit Molekülen verbunden sein, die zur Erhöhung ihrer Löslichkeit in vitro oder in vivo in der Lage sind.

[0064] Die hierin bereitgestellten Verbindungen können ebenfalls mit Molekülen verbunden sein, die dazu in der Lage sein, das renale therapeutische Mittel an das erwünschte Gewebe bereitzustellen. Beispielsweise kann ein Antikörper, Antikörper-Fragment oder irgendein anderes Bindungsprotein, das spezifisch mit einem Oberflächenmolekül auf Zellen des erwünschten Gewebes wechselwirkt, verwendet werden. Nützliche Targeting-Moleküle können beispielsweise unter Verwendung der Einkettenbindungsstellen-Technologie entwickelt werden, die beispielsweise im US-Patent Nr. 5 091 513 offenbart ist.

[0065] Der Fachmann auf dem Gebiet wird anerkennen, dass die formulierten Zusammensetzungen therapeutisch wirksame Mengen des renalen therapeutischen Mittels enthalten. Das heißt, sie enthalten Mengen, die geeignete Konzentrationen des Mittels an Nierengewebe für eine Zeitspanne bereitstellen, die ausreicht, um den permanenten oder progressiven Verlust einer Nierenfunktion zu vermeiden, zu hemmen, zu verzögern oder zu lindern oder in anderer Weise eine therapeutische Wirksamkeit bereitzustellen. Wie der Fachmann auf dem Gebiet erkennen wird, variiert die Konzentration der in einer therapeutischen Zusammensetzung der vorliegenden Erfindung beschriebenen Verbindungen abhängig von mehreren Faktoren, einschließlich der biologischen Wirksamkeit des ausgewählten Mittels, den chemischen Eigenschaften (beispielsweise Hydrophobie) der verwendeten Verbindungen, der Formulierung der Verbindungs-Träger, dem Verabreichungsweg und der ins Auge gefassten Behandlung, einschließlich, ob der aktive Inhaltsstoff direkt in die Niere oder die Nieren-Kapsel verabreicht wird oder ob er systemisch verabreicht werden wird. Die bevorzugte zu verabreichende Dosierung hängt wahrscheinlich von solchen Variablen ab, wie dem Zustand des Nierengewebes, dem Ausmaß des Nierenfunktions-Verlustes und dem Gesamtgesundheitszustand des speziellen Subjektes. Dosierungen können kontinuierlich oder täglich verabreicht werden, es ist jedoch gegenwärtig bevorzugt, dass Dosierungen einmal, zweimal oder dreimal pro Woche verabreicht werden, so lange eine zufriedenstellende Reaktion vorliegt (wie beispielsweise durch Stabilisierung und/oder Verbesserung der Nierenfunktion durch geeignete medizinische Marken und/oder Lebensqualitätindizes gemessen). Weniger häufige Dosierungen, beispielsweise monatliche Dosierungen, können ebenfalls verwendet werden. Für Subjekte, die in anderer Weise eine kontinuierliche, zweimal wöchentliche oder dreimal wöchentliche Hämodialyse-Sitzung erfordern, sind zweimal wöchentliche oder dreimal wöchentliche intravenöse oder intraperitoneale Infusionen nicht ungebührlich unbequem. Zusätzlich kann zur Vereinfachung häufiger Infusionen eine Implantation eines semi-permanenten Stents (beispielsweise intravenös, intraperitoneal oder intrakapsulär) ratsam sein.

[0066] Die nierentherapeutischen Mittel der vorliegenden Erfindung können natürlich alleine oder in Kombination mit anderen Molekülen verabreicht werden, von denen bekannt ist, dass sie bei der Behandlung der hierin beschriebenen Zustände von Vorteil sind. Wenn sie in Kombination mit anderen Mitteln verwendet werden, kann es vorteilhaft sein, die Dosierungen der renalen therapeutischen Mittel der vorliegenden Erfindung demgemäß zu verändern.

[0067] Die Ausübung der Erfindung einschließlich zusätzlicher bevorzugter Aspekte und Ausführungsformen hiervon wird aus den nachfolgenden Beispielen noch vollständiger verständlich werden, die hierin lediglich zu Veranschaulichungszwecken dargelegt sind und den Umfang der Erfindung auf keine Weise einschränken sollen.

Beispiele

Rattenrestnieren-Modell

[0068] Ein Ratten-Teil(5/6)-Nephrektomie oder ein Ratten-Restnierenmodell (RRKM) wurde im Wesentlichen wie beschrieben verwendet (Vukicevic et al. (1987), J. Bone Mineral Res. 2: 533). Männliche Ratten (2–3 Monate alt mit einem Gewicht von ungefähr 150–200 g) wurden einer unilateralen Nephrektomie (entweder linke

oder rechte Niere) unterworfen. Nach ungefähr einer Woche wurden zwei Drittel der verbleibenden Niere chirurgisch entfernt. Unmittelbar nach dem chirurgischen Eingriff stiegen die Plasmakreatinin- und BUN-Konzentrationen aufgrund des Verlustes der Nierenmasse und -funktion dramatisch an. Über die nächsten mehreren Wochen dieser „Akut“-Versagensphase nehmen Plasmakreatinin- und BUN-Konzentrationen überlebender Tiere ein wenig hin zu normalen Werten ab, bleiben jedoch erhöht. Die Nierenfunktion erscheint dann für eine Zeitspanne variabler Dauer relativ konstant oder stabil zu bleiben. Nach diesem Punkt treten die Tiere in eine Zeitspanne chronischen Nierenversagens ein, bei dem eine im Wesentlichen lineare Abnahme der Nierenfunktion auftritt, die mit dem Tod endet.

[0069] Als chirurgische Kontrollen wurden zusätzliche Tiere einer „Schein“-Operation unterworfen, bei der die Nieren entkapselt wurden, bei denen jedoch kein Nierengewebe entfernt wurde.

Interventionsmodell für das chronische Nierenversagen

[0070] Bei diesem Modell wurden sowohl nephrektomisierte als auch Schein-operierte Ratten für ungefähr 5–6 Monate nach dem chirurgischen Eingriff erhalten. Bei diesem Punkt befanden sich die überlebenden nephrektomisierten Tiere nach der stabilen Phase und waren in die Phase des chronischen Nierenversagens eingetreten.

[0071] Ratten wurden in 8 Gruppen mit jeweils 12 Ratten pro Gruppe eingeteilt. Zwei Gruppen von nephrektomisierten Ratten wurden als Kontrollen (Nx Kontrollen) verwendet, wobei eine dieser Gruppen überhaupt keine Behandlung empfing, wohingegen die andere Injektionen lediglich von Träger-Puffer empfing. Zusätzlich wurden 2 Gruppen Schein-operierter Ratten als Kontrollen verwendet (Scheinkontrollen), wobei eine Gruppe lediglich den Träger-Puffer empfing, wohingegen die andere lösliches OP-1 (sOP-1) bei 10 µg/kg Körpergewicht empfing. 4 experimentelle Gruppen nephrektomisierter Ratten wurden verwendet, die sOP-1 zu 1, 3, 10 oder 50 µg/kg Körpergewicht durch intraperitoneale Injektion empfingen (OP-1 Nx Tiere). OP-1-behandelte und lediglich Träger-behandelte Ratten empfanden 3 Injektionen pro Woche für 4–8 Wochen. Das Gesamtinjektionsvolumen betrug 300 µl. Keine statistisch signifikanten Unterschiede wurden zwischen den beiden Nx-Kontrollgruppen oder zwischen den beiden Schein-Kontrollgruppen beobachtet.

[0072] Im Vergleich zu der Scheingruppe, die lediglich Träger empfing, zeigte die NX-Kontrolle, die lediglich Träger empfing, signifikant ($p < 0,01$) erhöhtes Serumkreatinin (**Fig. 1**) beim Ende der Studie, was auf einen signifikanten Verlust der Nierenfunktion hinweist. Obwohl die nephrektomisierten Ratten, die entweder mit 1 oder 3 µg/kg Körpergewicht sOP-1 behandelt wurden, kein signifikant reduziertes Serumkreatinin zeigten, wenn sie mit der Nx-Kontrolle verglichen wurden, zeigten nephrektomisierte Ratten, die mit sOP-1 bei Dosen bei 10 oder 50 µg/kg Körpergewicht behandelt wurden, signifikante ($p < 0,05$) Reduktionen der Kreatinin-Werte (**Fig. 1**). Ähnliche Werte wurden für Serumharnstoff-Werte beobachtet: Obwohl nephrektomisierte Ratten, die entweder mit 1 oder 3 µg/kg Körpergewicht sOP-1 behandelt wurden, keine signifikant reduzierten Serum-Urea aufwiesen, wenn sie mit der Nx-Kontrolle verglichen wurden, zeigten nephrektomisierte Ratten, die mit sOP-1 in Dosen von 10 oder 50 µg/kg Körpergewicht behandelt wurden, signifikante ($p < 0,01$) Reduktionen der Serumurea-Werte (**Fig. 2**). Alle nephrektomisierten Ratten zeigten signifikant ($p < 0,01$) höheres Serumurea im Vergleich zu den Schein-operierten Ratten (**Fig. 2**):

[0073] Histologische Beobachtungen zeigen, dass im Gegensatz zu den Träger-behandelten Nx-Kontrollgruppen, OP-1-behandelte nephrektomisierte Ratten eine relativ normale glomeruläre Histologie zeigen. **Fig. 3** zeigt beispielsweise typische Nierenproben von (a) unbehandelten Nx-Kontrolltieren und (b) OP-1-behandelten nephrektomisierten Ratten unter geringer Vergrößerung (10 ×). **Fig. 4** zeigt ähnliche Proben unter einer hohen Vergrößerung (40 ×). Histomorphometrische Analysen zeigen, dass OP-1-Nx-Ratten eine reduzierte Inzidenz für eine glomeruläre Sklerose und Schleifenkollaps, relative verstreute Sklerose und Mikroaneurysmen und lebensfähiger Glomeruli im Vergleich zu Nx-Kontroll-Ratten (Tabelle 1) zeigten.

[0074] Keine der Ratten starb in irgendeiner Gruppe während dieser Studie.

Prophylaktisches Modell für das chronische Nierenversagen

[0075] Ratten wurden Teilnephrektomien unterworfen oder Schein-operiert, wie oben beschrieben. In diesem Modell ließ man die Ratten, um die Fähigkeit von OPBMP-renalen therapeutischen Mitteln zu testen, den Beginn des chronischen Nierenversagens zu vermeiden, zu hemmen oder zu verzögern, sich für ungefähr 2 Wochen nach dem chirurgischen Eingriff vor Beginn der OP-1-Therapie erholen. An diesem Zeitpunkt befanden sich die überlebenden Tiere nach der akuten Nierenversagen-Phase und waren noch nicht in das chronische Nierenversagen eingetreten.

[0076] Die Ratten wurden in zwei Gruppen von 15–20 Ratten eingeteilt. Eine Gruppe enthielt lediglich den Träger-Puffer (Nx-Kontrolle), wohingegen die andere eine OP-1-Behandlung zu 10 µg/kg Körpergewicht empfing, die dreimal pro Woche intraperitoneal verabreicht wurde.

[0077] Eine Verabreichung von OP-1 oder Träger wurde für eine Zeitspanne von ungefähr 8–9 Wochen fort-

geführt.

[0078] Während der Wochen 1–5 der Behandlung zeigten beide Gruppen erhöhte Serumkreatinin (> 100 µmol/l) bezüglich Schein-operierter Kontrollen ($35 \pm 7 \mu\text{mol/l}$). Bei ungefähr 5 Wochen begannen beide Gruppen einen Anstieg des Serumkreatinins zu zeigen, was den Beginn eines progressiven oder chronischen Nierenversagens nahelegt. Die Zunahme des Serumkreatinin war jedoch bemerkenswert weniger schnell bei der OP-1-behandelten Gruppe und war signifikant geringer als bei den Nx-Kontrollen (Fig. 5: $p < 0,02$ bei Wochen 6 und 8; $p < 0,01$ bei Wochen 7 und 9). Ähnliche Ergebnisse wurden bei den Serum-BUN-Werten ebenso beobachtet.

[0079] Noch bedeutender zeigten Messungen der GFR, basierend auf Serum- und Urin-Kreatininwerten, eine hochsignifikante Abnahme in beiden Gruppen nephrektomisierter Ratten (< 1,8 ml/Min.) bezüglich Schein-operierter Kontrollen ($4,7 \pm 1,1 \text{ ml/Min.}$). Die GFR in beiden Gruppen nahm kontinuierlich während Wochen 1–3 der Behandlung ab. Ungefähr bei 3 Wochen jedoch stabilisierte sich die GFR in den OP-1-behandelten Gruppen, wohingegen die Abnahme der Nierenfunktion in den Nx-Kontrollratten sich fortsetzte. Bei Woche 5 wurde der Unterschied der GFR-Werte zwischen OP-1-behandelten und Nx-Kontrollratten statistisch signifikant ($p < 0,02$). Dieser Unterschied der GFR nahm über die Zeit zu ($p < 0,01$ bei Woche 6; $p < 0,001$ bei Wochen 7 und 8), wenn die Nx-Kontrollen weiter abnahmen, jedoch die OP-1-behandelten Ratten stabil blieben (Fig. 6). Am Ende von 9 Wochen waren 40% der Nx-Kontrollratten tot, wohingegen keine der OP-1-behandelten Ratten gestorben war.

[0080] Eine histologische Auswertung von Gewebsschnitten bestätigte, dass OP-1-behandelte Ratten eine größere Erhaltung oder Aufrechterhaltung von Glomeruli zeigte, ebenso wie der proximalen und distalen Tubulus-Strukturen. Es existierten ebenfalls Anzeichen bei den OP-1-behandelten Ratten von nephrogenen mesenchymalen Kondensationen und das Auftreten von nephrogenen Entwicklungsstrukturen. Tabelle 1 berichtet von Ergebnissen mehrerer Standard-quantitativer (beispielsweise PAS-Färbung extrazellulärer Matrix) und semiquantitativer (beispielsweise visuelle Einordnung) histomorphometrischer Messungen, die für Gewebsschnitte aus Nx-Kontroll- und OP-1-behandelten Nx-Ratten gewonnen wurden. Diese Ergebnisse zeigen, dass die OP-1-Behandlung nephrektomisierter Ratten eine Gesamtverbesserung (oder eine reduzierte Degeneration) der Nierengewebsmorphologie, eine erhöhte mesangiale oder perivaskuläre Verdickung, eine gesenkten glomeruläre Sklerose und Schlaufen-Kollaps, ein gesenktes Auftreten einer „verstreuten“ Sklerose oder von Mikroaneurysmen und eine Zunahme lebensfähiger Glomeruli mit sich brachte.

Tabelle 1

| Gruppe | Normale Histologie | Mesangiale Verdickung | Glomeruläre Sklerose und Schlaufen-Kollaps | Verstreute Sklerose und Mikroaneurysmen | Fehlen lebensfähiger Glomeruli |
|------------------|--------------------|-----------------------|--|---|--------------------------------|
| Kontrolle (N=15) | $2,58 \pm 0,22$ | $27,3 \pm 2,4$ | $26,5 \pm 3,5$ | $34,7 \pm 4,2$ | $8,9 \pm 0,7$ |
| OP-1 (N=20) | $11,41 \pm 1,1$ | $58,6 \pm 3,2$ | $14,7 \pm 1,3$ | $11,8 \pm 1,1$ | $2,5 \pm 0,2$ |
| Signifikanz | $p < 0,01$ | $p < 0,01$ | $p < 0,02$ | $p < 0,01$ | $p < 0,01$ |

Äquivalente

[0081] Die Erfindung kann in speziellen Formen ausgeführt werden. Die vorhergehenden Ausführungsformen sollen deswegen in allen Aspekten eher als veranschaulichend als die hierin beschriebene Erfindung einschränkend betrachtet werden. Der Umfang der Erfindung wird somit durch die beigefügten Ansprüche angezeigt.

Patentansprüche

1. Verwendung eines osteogenetischen Proteins/Knochen-morphogenetischen Proteins zur Herstellung eines Medikamentes für
 - (a) die Prophylaxe oder die Behandlung eines chronischen Nierenversagens bei einem Säugetier; oder
 - (b) die Verzögerung des Bedarfs nach, oder die Reduzierung der Häufigkeit von chronischen Dialysebehandlungen.
2. Verwendung nach Anspruch 1, wobei das OP/BMP
 - (a) ein Polypeptid umfasst, das zumindest aus einer C-terminalen Cystein-domäne eines Proteins besteht, aus-

gewählt aus einem Polypeptid, das aus OP-1, OP-2, OP-3, BMP2, BMP3, BMP4, BMP5, BMP6 und BMP9 ausgewählt ist; oder

(b) ein Polypeptid umfasst, das zumindest aus einer C-terminalen Cystein-domäne eines Proteins besteht, das aus humanem OP-1 ausgewählt ist; oder

(c) ein Polypeptid umfasst, das zumindest 70% Homologie mit einer Aminosäuresequenz einer C-terminalen Sieben-Cystein-Domäne von humanem OP-1 aufweist (wobei das Polypeptid beispielsweise Folgendes aufweist:

(i) zumindest 75% Homologie mit einer Aminosäuresequenz einer C-terminalen Sieben-Cystein-Domäne von humanem OP-1; oder

(ii) zumindest 80% Homologie mit einer Aminosäuresequenz einer C-terminalen Sieben-Cystein-Domäne von humanem OP-1; oder

(iii) zumindest 60% Identität mit einer Aminosäuresequenz einer C-terminalen Sieben-Cystein-Domäne von humanem OP-1; oder

(iv) zumindest 65% Identität mit einer Aminosäuresequenz einer C-terminalen Sieben-Cystein-Domäne von humanem OP-1; oder

(v) zumindest 70% Identität mit einer Aminosäuresequenz einer C-terminalen Sieben-Cystein-Domäne von humanem OP-1.

3. Verwendung nach Anspruch 1 oder Anspruch 2, wobei das OP/BMP

(a) die Knorpelbildung in einem ektopischen Knochen-Assay induziert;

(b) den Verlust der Nierenfunktion in einem Säugetiermodell des chronischen Nierenversagens verhindert, hemmt, verzögert oder lindert; oder

(c) eine klinisch signifikante Verbesserung eines Standardmarkers der Nierenfunktion verursacht, wenn es einem Säugetier bei einem chronischen Nierenversagen oder dem Risiko hiervon verabreicht wird; oder

(d) aus humanen osteogenetischen Proteinen und humanen Knochen-morphogenetischen Proteinen ausgewählt ist.

4. Verwendung nach einem der Ansprüche 1 bis 3, wobei:

(a) das Säugetier von einem Leiden betroffen ist, das aus chronischem Nierenversagen, einer Nierenerkrankung im Endstadium, chronischer diabetischer Nephropathie, diabetischer Glomerolupathie, diabetischer renaler Hypertrophie, hypertensiver Nephrosklerose, hypertensiver Glomerulosklerose, chronischer Glomerulonephritis, erblicher Nephritis und Nierendysplasie ausgewählt ist; oder

(b) eine Überprüfung einer Nierenbiopsie des Säugetiers anzeigt, dass das Säugetier von einem Leiden betroffen ist, ausgewählt aus glomerulärer Hypertrophie, tubulärer Hypertrophie, Glomerulosklerose und tubulointerstitieller Sklerose; oder

(c) eine Überprüfung des Säugetiers eine Nierenfibrose anzeigt.

5. Verwendung nach Anspruch 4, wobei

(a) die Überprüfung ein Ultraschall-, MRI- oder CAT- Scanning des Säugetiers ist; oder

(b) das Säugetier eine Anzahl von funktionellen Nephron-Einheiten besitzt, die weniger als ungefähr 50% der Anzahl von funktionellen Nephron-Einheiten darstellt, die in einem Säugetier mit intakten gesunden Nieren vorliegen; oder

(c) das Säugetier eine Anzahl von funktionellen Nephron-Einheiten besitzt, die weniger als ungefähr 40% der Anzahl von funktionellen Nephron-Einheiten darstellt, die in einem Säugetier mit intakten gesunden Nieren vorliegen; oder

(d) das Säugetier eine Anzahl von funktionellen Nephron-Einheiten besitzt, die weniger als ungefähr 30% einer Anzahl von funktionellen Nephron-Einheiten darstellt, die in einem Säugetier mit intakten gesunden Nieren vorliegen; oder

(e) das Säugetier eine Anzahl von funktionellen Nephron-Einheiten besitzt, die weniger als ungefähr 20% einer Anzahl von funktionellen Nephron-Einheiten darstellt, die in einem Säugetier mit intakten gesunden Nieren vorliegen.

6. Verwendung nach Anspruch 4 oder 5, wobei

(a) das Säugetier Empfänger eines Nierentransplantats ist; oder

(b) das Säugetier nur eine Niere besitzt; oder

(c) die Untersuchung eines Harnsediments des Säugetiers das Vorhandensein von breiten Harnzylindern anzeigt.

7. Verwendung nach einem der Ansprüche 4 bis 6, wobei

(a) das Säugetier eine GFR aufweist, die chronisch weniger als ungefähr 50% einer GFR_{exp} für das Säugetier

beträgt; oder

- (b) das Säugetier eine GFR aufweist, die chronisch weniger als ungefähr 40% einer GFR_{exp} für das Säugetier beträgt; oder
- (c) das Säugetier eine GFR aufweist, die chronisch weniger als ungefähr 30% einer GFR_{exp} für das Säugetier beträgt; oder
- (d) das Säugetier eine GFR aufweist, die chronisch weniger als ungefähr 20% einer GFR_{exp} für das Säugetier beträgt.

8. Verwendung nach einem der Ansprüche 4 bis 7, wobei

- (a) das Säugetier ein Mann ist, der zumindest ungefähr 50 kg wiegt und eine GFR aufweist, die chronisch weniger als ungefähr 50 ml/Minute beträgt; oder
- (b) das Säugetier ein Mann ist, der zumindest ungefähr 50 kg wiegt und eine GFR aufweist, die chronisch weniger als ungefähr 40 ml/Minute beträgt; oder
- (c) das Säugetier ein Mann ist, der zumindest ungefähr 50 kg wiegt und eine GFR aufweist, die chronisch weniger als ungefähr 30 ml/Minute beträgt; oder
- (d) das Säugetier ein Mann ist, der zumindest ungefähr 50 kg wiegt und eine GFR aufweist, die chronisch weniger als ungefähr 20 ml/Minute ist.

9. Verwendung nach einem der Ansprüche 4 bis 8, wobei

- (a) das Säugetier eine Frau ist, die zumindest ungefähr 40 kg wiegt und eine GFR aufweist, die chronisch weniger als ungefähr 40 ml/Minute beträgt;
- (b) das Säugetier eine Frau ist, die zumindest ungefähr 40 kg wiegt und eine GFR aufweist, die chronisch weniger als ungefähr 30 ml/Minute beträgt;
- (c) das Säugetier eine Frau ist, die zumindest ungefähr 40 kg wiegt und eine GFR aufweist, die chronisch weniger als ungefähr 20 ml/Minute beträgt; oder
- (d) das Säugetier eine Frau ist, die zumindest ungefähr 40 kg wiegt und eine GFR aufweist, die chronisch weniger als ungefähr 10 ml/Minute beträgt.

10. Verwendung nach einem der vorhergehenden Ansprüche zur Reduzierung der Serumkreatinin-Konzentrationen in dem Säugetier um zumindest ungefähr 5% über 3 Monate.

11. Verwendung nach einem der vorhergehenden Ansprüche zur Stabilisierung eines klinischen Indikators der Nierenfunktion nach ungefähr 3 Monaten der Behandlung im Vergleich zu einer Verschlechterung des Indikators vor der Behandlung.

12. Verwendung nach einem der vorhergehenden Ansprüche, wobei das Medikament:

- (a) oral; oder
- (b) parenteral, beispielsweise intravenös, intraperitoneal oder in die Nierenkapsel zu verabreichen ist.

13. Verwendung nach Anspruch 12, wobei dem Säugetier für diese Verabreichung ein Stent implantiert wurde, wobei der Stent beispielsweise Folgendes ist:

- (a) ein intravenöser Stent; oder
- (b) ein intraperitonealer Stent; oder
- (c) ein renaler intrakapsulärer Stent.

14. Verwendung nach Anspruch 12, wobei die Verabreichung durch eine implantierte Vorrichtung erfolgt.

15. Verwendung nach einem der vorhergehenden Ansprüche, wobei die Verabreichung:

- (a) zumindest einmal pro Woche für eine Zeitspanne von zumindest ungefähr einem Monat; oder
- (b) zumindest einmal pro Monat über eine Zeitspanne von zumindest ungefähr einem Jahr;
- (c) in einer Dosierung von ungefähr 0,01 bis 1200 µg/kg Körpergewicht des Säugetiers (beispielsweise in einer Dosierung von ungefähr 10 bis 300 µg/kg Körpergewicht des Säugetiers) erfolgt.

Es folgen 6 Blatt Zeichnungen

Anhängende Zeichnungen

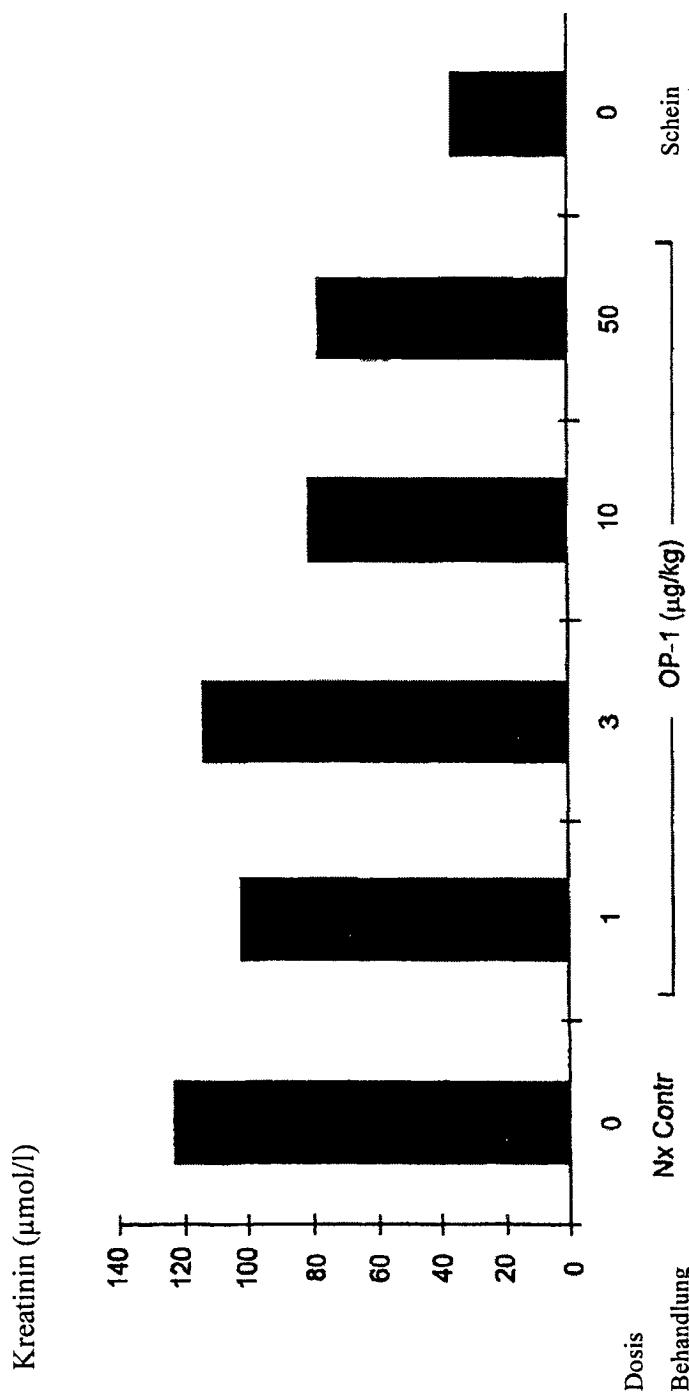


FIG. 1

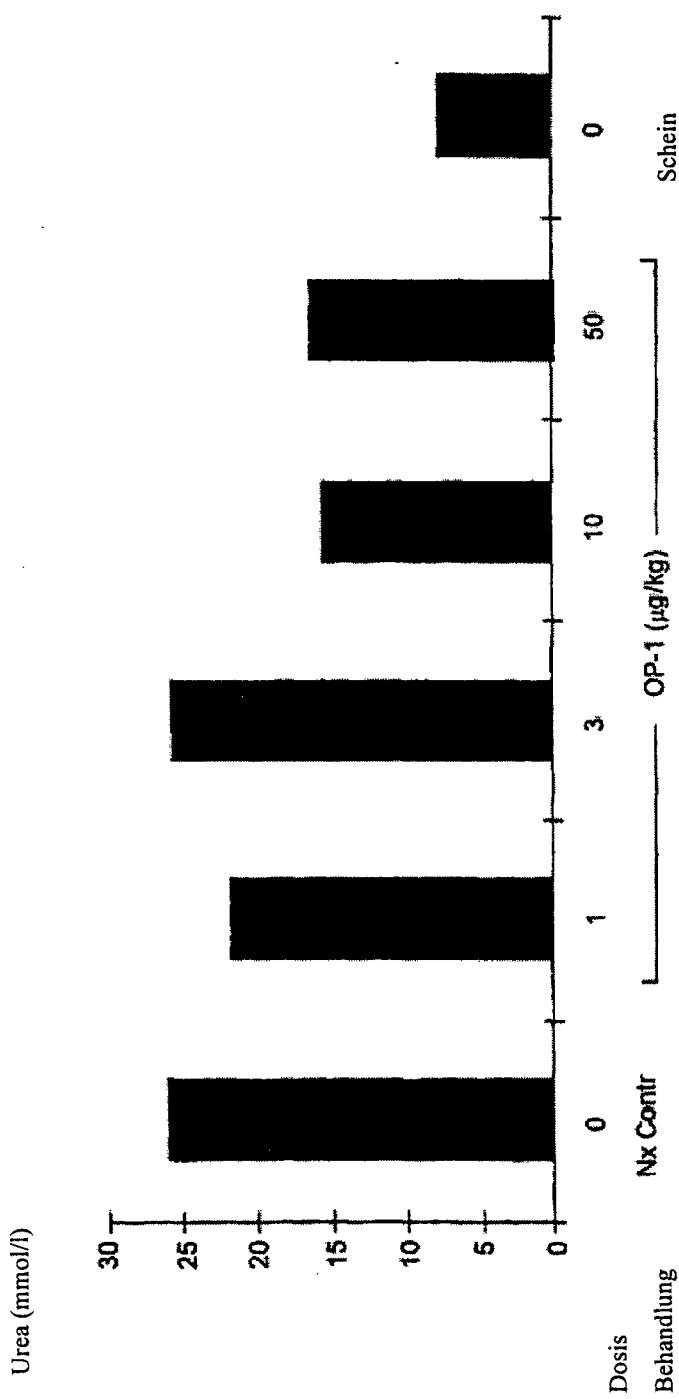


FIG. 2

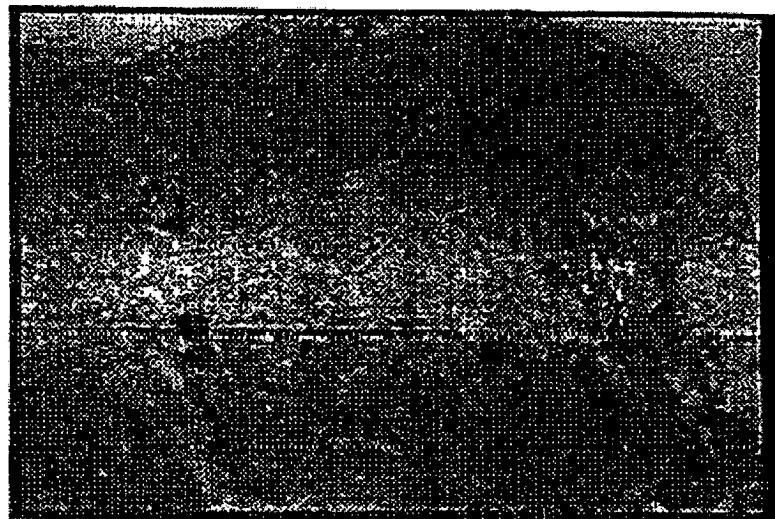


FIG. 3B

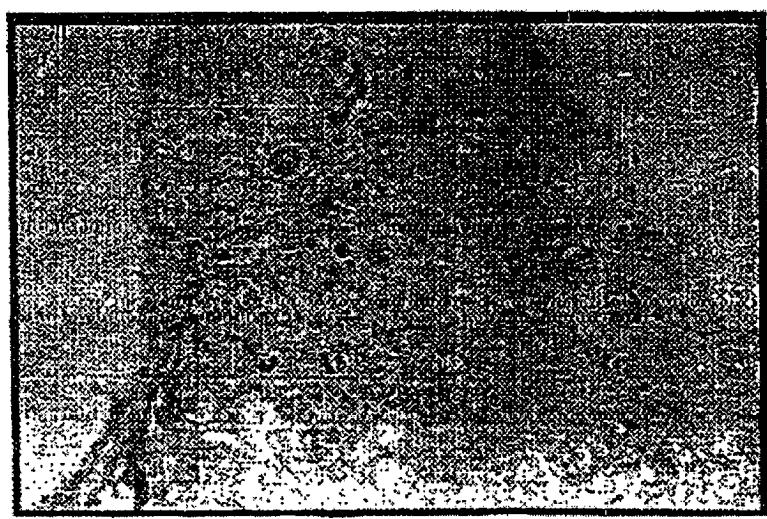


FIG. 3A

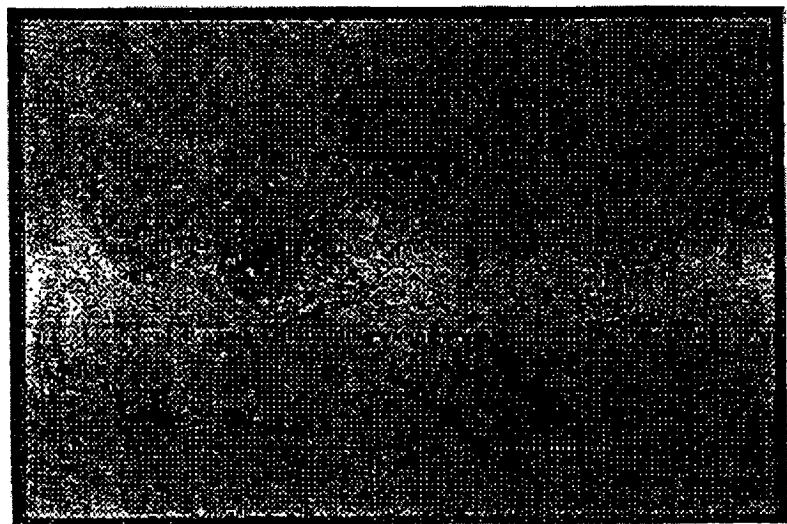


FIG. 4B



FIG. 4A

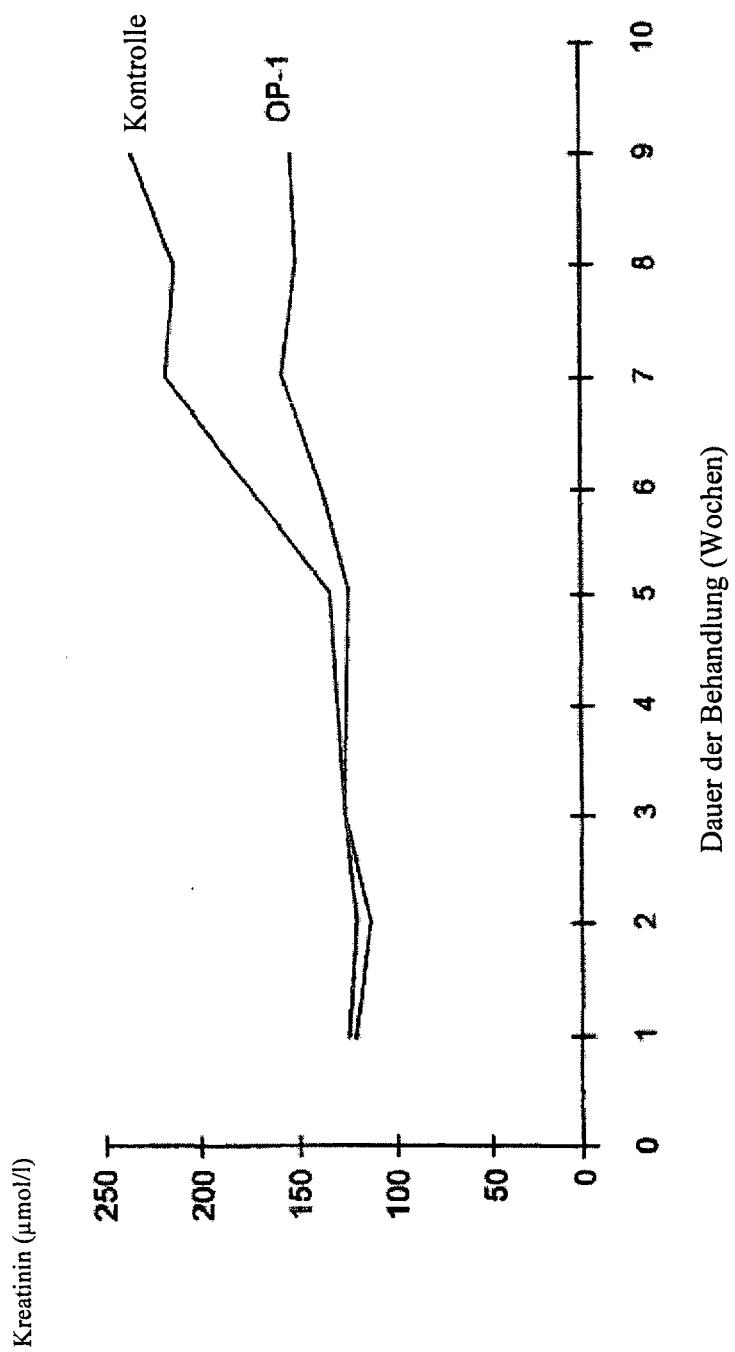


FIG. 5

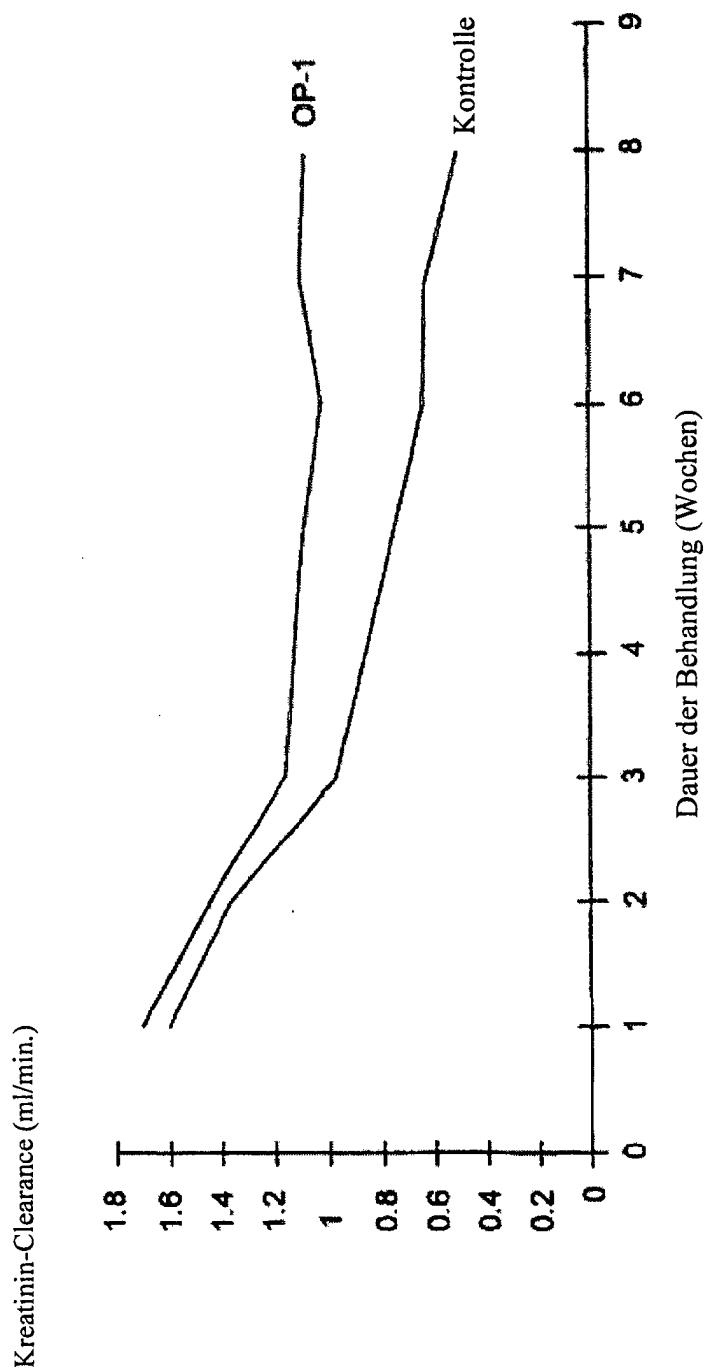


FIG. 6