



(19)
Bundesrepublik Deutschland
Deutsches Patent- und Markenamt

(10) **DE 699 27 147 T2** 2006.01.26

(12)

Übersetzung der europäischen Patentschrift

(97) **EP 1 073 456 B1**

(21) Deutsches Aktenzeichen: **699 27 147.9**

(86) PCT-Aktenzeichen: **PCT/US99/08793**

(96) Europäisches Aktenzeichen: **99 918 766.9**

(87) PCT-Veröffentlichungs-Nr.: **WO 99/053942**

(86) PCT-Anmeldetag: **21.04.1999**

(87) Veröffentlichungstag

der PCT-Anmeldung: **28.10.1999**

(97) Erstveröffentlichung durch das EPA: **07.02.2001**

(97) Veröffentlichungstag

der Patenterteilung beim EPA: **07.09.2005**

(47) Veröffentlichungstag im Patentblatt: **26.01.2006**

(51) Int Cl.⁸: **A61K 38/17** (2006.01)

A61P 9/00 (2006.01)

A61P 9/10 (2006.01)

(30) Unionspriorität:

64832 23.04.1998 US

(73) Patentinhaber:

Amgen Inc., Thousand Oaks, Calif., US

(74) Vertreter:

**Grünecker, Kinkeldey, Stockmair &
Schwanhäusser, 80538 München**

(84) Benannte Vertragsstaaten:

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

(72) Erfinder:

**SIMONET, Scott, Thousand Oaks, US; SAROSI,
Ildiko, Newbury Park, US**

(54) Bezeichnung: **VERWENDUNG VON OSTEOPROTEGERIN ZUR VORBEUGUNG UND BEHANDLUNG CARDIO-VASKULÄRER ERKRANKUNGEN**

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

Gebiet der Erfindung

[0001] Die Erfindung bezieht sich auf die Behandlung von kardiovaskulären Erkrankungen. Insbesondere umfaßt die Erfindung die Verwendung von Osteoprotegerin (OPG), um kardiovaskuläre Erkrankungen, die mit einem Verschluß und einer Verkalkung von Blutgefäßen einhergehen, wie z.B. Atherosklerose, zu behandeln und zu vermeiden.

Hintergrund der Erfindung

[0002] Die Entwicklung und der Erhalt des Säugetier-Skeletts umfaßt die Regulierung und Interaktion seiner einzelnen Zelltypen (Erlebacher et al. Cell 80, 371-380 (1995); Marks, Acta Med. Dent. Helv. 2, 141-157 (1997)). Die wesentlichen an der Skelettarchitektur beteiligten Zelltypen schließen Chondrozyten ein, die Knorpel bilden, Osteoblasten, die Knochenmatrix synthetisieren und deponieren sowie Osteoclasten, die Knochen resorbieren. Die Chondrozyten stammen von Mesenchymzellen ab, und ihre Rolle besteht darin, eine initiale Knorpel-Matrize zu bilden, die für die endochondrale Knochenbildung erforderlich ist. Osteoblasten, die von mesenchymalen Osteoprogenitorzellen abstammen, sind auf der Knochenoberfläche lokalisiert, wo sie Matrixproteine synthetisieren, transportieren und anordnen. Osteoclasten stammen von Granulozyten-Monozyten-Vorläufern ab, die im hämatopoetischen Knochenmark vorliegen (Roodman, Endocrine Rev. 17, 308-332 (1996); Mundy, J. Bone Min. Res. 8, S505-S510 (1993); Manolagas und Jilka, New Eng. J. Med. 332, 305-311 (1995)). Nachdem die Osteoclasten sich fest an die Knochenoberfläche angeheftet haben, bilden sie Resorptionszonen, die durch eine besondere Struktur, als „ruffled border“ bekannt, angesäuert werden. Die „ruffled border“ leitet das Sekret („secretory conduit“) und sezerniert Protonen und saure Proteasen, die das Calcium aus der Knochenmatrix entfernen und diese dann verdauen. Man nimmt an, dass während des Vorgangs der Osteoclasten-vermittelten Resorption Proteinfaktoren gebildet werden, die als Signalmoleküle für einen Start der Knochenneubildung durch Osteoblasten dienen. Osteoblasten wiederum können die Osteoclastenfunktion durch die Expression löslicher oder an die Membran gebundener Regulatoren beeinflussen (Takahashi et al., Endocrinology 123, 2600-2602 (1988)). Die Kopplung zwischen den Funktionen von Osteoblasten und Osteoclasten ist kritisch für die Ausbildung, dem „Remodeling“ und der Reparatur des Skeletts (Mundy, J. Cell Biochem. 53, 296-300 (1993); Mundy et al., Bone 17, 71S-75S F (1995)). Osteoporose in der Postmenopause, die häufigste Knochenkrankheit in der entwickelten Welt, wurde in einen kausalen Zusammenhang mit einem Östrogenverlust gestellt (einen Überblick gibt: Pacifici, J. Bone Min. Res. 11, 1043-1051 (1996)).

[0003] Postmenopausaler Knochenverlust kann auf einen Verlust der regulatorischen Kontrolle von Östrogen auf die Produktion von Zytokinen und anderen Faktoren, die die Osteoclastenentwicklung steuern, zurückgeführt werden. Die entstehende Verlagerung in dem Gleichgewicht zwischen Osteoclasten- und Osteoblasten-aktivierenden Faktoren begünstigt einen Nettoverlust an Knochenmasse, der letztlich zur Osteoporose führt.

[0004] In menschlichen Populationen wurde Osteoporose mit einem vermehrten Auftreten arterieller Verkalkung, ein Faktor vieler atherosklerotischer Läsionen, in Verbindung gebracht (Parhami und Demer, Curr. Opin. Lipidology 8, 312-314 (1997); Banks et al., Eur. J. Clin. Invest. 24, 813-817 (1994); Parhami et al., Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol. 17, 680-687 (1997)). Gemeinsame Faktoren können die Grundlage für die Pathogenese dieser zwei Erkrankungen sein. Tatsächlich scheinen einige arterielle Calciummineral-Ablagerungen identisch zu denen in voll ausgebildeten lamellaren Knochen sein, einschließlich Trabeculae, Lacunae und Knochenmarksinseln (Haust und Geer, Am. J. Pathol. 60, 329-346 (1970); Bunting, J. Exp. Med. 8, 365-376 (1906)). Darüber hinaus wurde gezeigt, dass verkalkte Arterien zahlreiche Knochenmatrixproteine exprimieren, einschließlich Kollagen Typ I, Matrix-GLA-Protein, Osteocalcin, Osteonectin und „bone morphogenetic protein“ Typ 2 (Bostrom et al., J. Clin. Invest. 91, 1800-1809 (1993); O'Brien et al., Circulation 92, 2163-2168 (1995); Giachelli et al., J. Clin. Invest. 92, 1686-1696 (1993); Bostrom et al., Am. J. Cardiol. 75, 88B-91B (1995)). Diese Befunde führten zur Spekulationen darüber, dass die arterielle Verkalkung ein organisierter und regulierter Vorgang ist, bei dem die zellulären und molekularen Mechanismen ähnlich denen der organisierten Knochenbildung sind (Demer, Circulation 92, 2029-2032 (1995); Parhami et al., J. Atheroscler. Thromb. 3, 90-94 (1996)).

[0005] Osteoprotegerin (OPG), ein kürzlich identifiziertes Mitglied der Tumornekrosefaktor-Rezeptorgen-Supertamilie, ist ein sezernierter Faktor, der die Osteoclastenentwicklung sowohl in vitro als auch in vivo hemmt (Simonet et al. Cell 89, 309-319 (1997); PCT Anmeldung Nr. US96/20621 (W097/23614)). Transgene Mäuse überexprimieren OPG in der Leber, weisen hohe OPG-Proteinspiegel in ihrem großen Blutkreislauf auf und zeigen einen auffälligen Anstieg in der Knochendichte (Osteopetrose). In normalen Mausembryonen wurde OPG

innerhalb von Knorpelrudimenten entwickelnder Knochen, im Dünndarm sowie der muskulären Wand der Aorta und zahlreichen großen Arterien gefunden.

[0006] Aufgrund der starken Korrelation zwischen dem Auftreten der Osteoporose und dem Ausbruch der Zustände, die zu einer kardiovaskulären Erkrankung führen können, insbesondere einer Erkrankung, die durch arterielle Verkalkung charakterisiert ist, sowie den Ähnlichkeiten in der Abläufen der Calciumablagerung im Knochen und entlang dem Inneren der Arterienwand, ist es ein Gegenstand der vorliegenden Erfindung, pharmazeutische Zusammensetzungen und Verwendungen davon zur Vermeidung und Behandlung einer kardiovaskulären Krankheit bereitzustellen. Die Entwicklung eines Therapeutikums zur Vermeidung und Behandlung kardiovaskulärer Erkrankungen würde die Lebensdauer und die Lebensqualität betroffenen Patienten sehr steigern, indem Zustände vermieden oder verzögert würden, die zu Hochdruck, Ischämie, Herzinfarkten und Schlaganfall führen können.

[0007] Überraschenderweise wurde gefunden, dass ein Verlust an OPG in OPG „knockout“ Tieren zu einer Verkalkung der Aorta und renaler Arterien führt, welches Orte endogener OPG-Expression in normalen Tieren sind. Diese Befunde legen nahe, dass OPG an der Regulation der pathologischen Verkalkung von Arterien in der Weise beteiligt ist, dass, wenn zirkulierendes OPG fehlt oder in geringen Spiegeln vorhanden ist, die Akkumulation von Calciumablagerungen auf arteriellen Wänden stark beschleunigt ist. Das Vorliegen normaler oder höherer als normaler OPG-Spiegel (wie in OPG-exprimierenden transgenen Mäusen) ist nicht mit einer Verkalkung von Gefäßen verbunden.

Zusammenfassung der Erfindung

[0008] Die vorliegende Erfindung betrifft die Verwendung von Zusammensetzungen, die Osteoprotegerin umfassen, zur Behandlung oder Vermeidung kardiovaskulärer Erkrankungen. Eine therapeutisch wirksame Menge an OPG ist zur Verwendung vorgesehen, wobei die genannte Menge ausreichend ist, um eine kardiovaskuläre Krankheit zu behandeln oder zu vermeiden.

[0009] Die vorliegende Erfindung betrifft auch OPG-Zusammensetzungen, die für die Behandlung oder Vermeidung von kardiovaskulären Erkrankungen nützlich sind. OPG-Zusammensetzungen sind typischerweise pharmazeutisch akzeptable Mischungen, die für verschiedene Routen der Verabreichung geeignet sind.

Beschreibung der Abbildungen

[0010] Abb. 1: Analyse einer in situ Hybridisierung der OPG-Expression auf gefrorenen Schnitten von einem embryonalen E17 Rattenherz (Teile A und B) und einer renalen Arterie einer adulten Ratte (Teile C und D). Mittels Lichtmikroskopie ist die Anwesenheit von OPG-mRNA als dunkle Körner auf der Aorta zu erkennen, die Hintergrundfärbung ist Methylgrün (A). Mittels Dunkelfeldmikroskopie der gleichen Probe ist eine starke OPG-mRNA-Expression auf den Rippen und der Aorta zu erkennen (B). Mittels Hell- und Dunkelfeldmikroskopie ist ein etwas schwächeres Signal in der renalen Arterie des adulten Rattenherzens zu erkennen (C bzw. D).

[0011] Abb. 2: Analyse einer in situ Hybridisierung der OPG-Expression auf Formalin-fixierten Schnitten eines E20.5 Rattenembryos. Mittels Lichtmikroskopie ist das Vorhandensein von OPG-RNA als dunkle Körner auf der Aorta erkennbar, die Hintergrundfärbung ist Hämalaun (Teile A, B und D). Mittels Dunkelfeldmikroskopie der gleichen Probe ist eine starke OPG-mRNA-Expression auf der Aorta zu sehen (Teile C und E). E20.5-Rattenembryo, 1/2 x Vergrößerung, der Schnitt wurde mit Hämatoxylin und Eosin gefärbt (A); 4X, H und E (B); 4X (C); 10X, H und E (D); 10X (E).

[0012] Abb. 3: Arterielle Verkalkung in einer männlichen OPG^{-/-}-Maus. OPG^{-/-}-Maus #26 zeigt Verkalkung und eine Proliferation der Intima in der absteigenden Aorta (Teil A) und der renalen Arterie (Teil B). OPG^{-/-}-Maus #38 zeigt eine ausgeprägte Verkalkung im Bulbus der Aorta (Teil C).

[0013] Die ausgeprägte subintimale Proliferation könnte aus einer Aortanwanddissektion mit nachfolgender Blutung in den Raum zwischen den Schichten der Aortawand folgen. Die Bildung eines Aneurysmas und eine Aortanwanddissektion ist eine häufige Komplikation bei der schweren Arteriosklerose. In der renalen Arterie liegt eine schwerwiegende Verkalkung sowie eine Proliferation der Intima und Media vor (Teil D).

[0014] Abb. 4: Arterielle Verkalkung in einer weiblichen OPG^{-/-}-Maus. Die Aorta von Wildtyp Maus #82 ist als negative Kontrolle gezeigt (Teil A). OPG^{-/-}-Maus #86 zeigt mehrere verkalkte Läsionen in der abdominalen Aorta (Teil B). OPG^{-/-}-Maus #77 zeigt zahlreiche Läsionen in der abdominalen Aorta (Teil D) und in zahlreichen

kleineren Verzweigungen (Teil C).

Detaillierte Beschreibung der Erfindung

[0015] Homozygote OPG^{-/-}-„knockout“-Mäuse zeigten nach Untersuchung mittels Ganzkörper-Röntgenstrahlung und Histologie eine schwerwiegende Osteoporose. Eine Charakterisierung der Knochenstruktur von OPG^{-/-}-„knockout“-Mäusen ist in dem anhängigen und in Mitbesitz befindlichen Patent mit der U.S. Seriennummer 08/943,687 beschrieben. Unerwarteterweise wurde gefunden, dass sowohl männliche als auch weibliche homozygote OPG^{-/-}-„knockout“-Mäuse auch eine ausgeprägte Verkalkung und Intimaproliferation in der Aorta und der renalen Arterie zeigen. Diese arteriellen Veränderungen wurden in heterozygoten OPG^{+/-}-„knockout“-Mäusen, in normalen Mäusen oder in transgenen Mäusen mit erhöhten zirkulierenden OPG-Spiegeln nicht beobachtet. OPG^{+/-}-Mäuse zeigen im Alter von 6 Monaten einen Knochenverlust. Zusammengenommen zeigen diese Beobachtungen eine Rolle für OPG bei der Vermeidung oder Reduktion arterieller Verkalkung sowie beim Verringern des Risikos für eine Artherosklerose an.

OPG-Polypeptide

[0016] OPG-Polypeptide der Erfindung schließen humanes OPG oder ein Derivat, eine verkürzte oder chemisch modifizierte Form davon ein, wobei mindestens eine der biologischen Aktivitäten von OPG vorhanden ist. Die Aminosäuresequenz von humanem OPG ist in SEQ ID NR. 1 und SEQ ID NR. 2 gezeigt. Ein Derivat von OPG bezieht sich auf ein Polypeptid, bei dem eine oder mehrere Aminosäuren addiert, entfernt, inseriert oder substituiert wurden, so dass das entstehende Polypeptid mindestens eine der biologischen Aktivitäten von OPG aufweist. Die biologischen Aktivitäten von OPG schließen Aktivitäten ein, die am Knochenmetabolismus beteiligt sind, sind aber nicht auf diese beschränkt. In einer Ausführungsform zeigen die OPG-Polypeptide eine antiresorptive Aktivität gegenüber Knochen. In einer anderen Ausführungsform weisen die OPG-Polypeptide eine die Verkalkung der arteriellen Wände reduzierende oder eliminierende Aktivität auf.

[0017] OPG-Polypeptide können reife OPG-Polypeptide sein, denen die aminoterminalen „leadersequenz“ mit 21 Aminosäuren entfernt wurde. Polypeptide schließen die Reste 22-401 ein, wie in SEQ ID NR. 1 gezeigt und Derivate davon, die Deletionen oder carboxyterminale Verkürzungen von Teilen oder sämtlichen OPG-Aminosäureresten 180-401 aufweisen; eine oder mehrere Aminosäureänderungen in den Resten 180-401; Entfernung eines Teils oder sämtlicher Aminosäuren einer cysteinreichen Domäne von OPG, insbesondere Entfernung der distalen (carboxyterminalen) cysteinreichen Domäne; und eine oder mehrere Aminosäureänderungen in einer cysteinreichen Domäne, insbesondere in der distalen (carboxyterminalen) cysteinreichen Domäne. In einer Ausführungsform werden OPG bis zu 216 Aminosäuren vom Carboxyterminus entfernt. In einer anderen Ausführungsform werden bis zu 10 Aminosäuren vom reifen Aminoterminus entfernt (wobei der reife Aminoterminus am Rest 22 liegt), und optional werden bis zu 216 Aminosäuren vom Carboxyterminus entfernt.

[0018] Weitere OPG-Polypeptide, die durch die Erfindung umfaßt sind, schließen die folgenden ein: humanes [22-180]-Fc Fusionsprotein, humanes [22-201]-Fc Fusionsprotein, humanes [22-401]-Fc Fusionsprotein, humanes [22-185]-Fc Fusionsprotein und humanes [22-194]-Fc Fusionsprotein. Diese Polypeptide werden in Säugetier-Wirtszellen, wie CHO oder 293 Zellen, hergestellt. Weitere OPG-Polypeptide, die durch die Erfindung umfaßt sind und in prokaryotischen Wirtszellen exprimiert werden, schließen die folgenden ein: humanes Met [22-401], Met Fc-humanes [22-401] Fusionsprotein (die Fc-Region ist an den Aminoterminus der kodierenden Gesamtlängen-OPG-Sequenz fusioniert), humanes Met [22-401]-Fc Fusionsprotein (die Fc-Region ist an den Carboxyterminus der Gesamtlängen-OPG-Sequenz fusioniert), Met Fc-humanes [22-201] Fusionsprotein, humanes Met [22-201]-Fc Fusionsprotein, Met-Fc-human [22-194], humanes Met [22-194]-Fc, humanes Met [27-401], humanes Met [22-185], humanes Met [22-189], humanes Met [22-194], humanes Met [22-194] (P25A), humanes Met [22-194] (P26A), humanes Met [27-185], humanes Met [27-189], humanes Met [27-194], humanes Met-Arg-Gly-Ser-(His)₆ [22-401], humanes Met-Lys [22-401], humanes Met-(Lys)₃-[22-401], humanes Met [22-401]-Fc (P25A), humanes Met [22-401] (P25A), humanes Met [22-401] (P26A), humanes Met [22-401] (P26D). Es sollte verstanden werden, dass die oben genannten, in prokaryotischen Wirtszellen hergestellten OPG-Polypeptide, einen aminoterminalen Methioninrest aufweisen, wenn dieser ein Rest nicht angegeben ist. In besonderen Beispielen wurden OPG-Fc-Fusionspolypeptide hergestellt, indem eine Region aus humanen IgG₁-γ1 mit 227 Aminosäuren verwendet wurde, die die Sequenz, wie in Ellison et al. gezeigt, aufweist (Nuc. Acids Res. 10, 4071-4079 (1982)). Varianten der Fc-Region humaner IgG können jedoch auch verwendet werden.

[0019] Eine Analyse der biologischen Aktivität der am Carboxyterminus verkürzten OPGs, die an die Fc-Region humaner IgG fusioniert wurden, zeigt, dass ein Teil von OPG mit ungefähr 164 Aminosäuren für die Akti-

vität erforderlich ist. Diese Region umfaßt die Aminosäuren 22-185, vorzugsweise die in SEQ ID NR: 1 gezeigten und umfaßt vier cysteinreiche Domänen, die charakteristisch für cysteinreiche Domänen der extrazellulären Domänen des Tumornekrosefaktor-Rezeptors (TNFR) sind.

[0020] Unter Ausnutzung der Homologie zwischen den cysteinreichen Domänen von OPG und TNFR-Familienmitgliedern wurde ein dreidimensionales Modell von OPG erstellt, das auf der bekannten Kristallstruktur der extrazellulären Domäne von TNFR-I basiert (siehe W097/23614). Dieses Modell wurde verwendet, um die Reste innerhalb von OPG zu identifizieren, die für eine biologische Aktivität wichtig sein könnten. Cysteinreste, die für den Erhalt der Struktur der vier cysteinreichen Domänen wichtig sind, wurden identifiziert. Die folgenden Disulfidbindungen wurden in dem Modell identifiziert: Domäne 1: Cys41 bis Cys54, Cys44 bis Cys62, Tyr23 und His 66 können die Stabilität der Struktur dieser Domänen bewirken; Domäne 2: Cys65 bis Cys80, Cys83 bis Cys98, Cys87 bis Cys105; Domäne 3: Cys107 bis Cys118, Cys124 bis Cys142; Domäne 4: Cys145 bis Cys160, Cys166 bis Cys185. Auch wurden Reste identifiziert, die in enger Nachbarschaft zu TNF β lagen, wie in den **Abb. 11** und 12A-12B in W097/23614 gezeigt. In diesem Modell wird angenommen, dass OPG an einen korrespondierenden Liganden bindet; TNF β wurde als ein Modell-Ligand verwendet, um die Interaktion von OPG mit seinem Liganden zu simulieren. Auf diesem Modell basierend könnten die folgenden Reste von OPG für die Ligandenbindung wichtig sein: Glu34, Lys43, Pro66 bis Gln91 (insbesondere Pro66, His68, Tyr69, Tyr70, Thr71, Asp72, Ser73, His76, Ser77, Asp78, Glu79, Leu81, Tyr82, Pro85, Val86, Lys88, Glu90 und Gln91), Glu153 und Ser155.

[0021] Änderungen von diesen Aminosäureresten, entweder von einzelnen Resten oder mehreren Resten in Kombination, können die biologische Aktivität von OPG verändern. So können z. B. Änderungen in bestimmten Cysteinresten die Struktur einzelner cysteinreicher Domänen verändern, wohingegen Änderungen in den Resten, die für die Ligandenbindung wichtig sind, die physikalischen Wechselwirkungen von OPG mit einem Liganden verändern können. Strukturmodelle können helfen, Analoga zu identifizieren, die mehr wünschenswerte Eigenschaften aufweisen, wie eine gesteigerte biologische Aktivität, größere Stabilität oder eine leichtere Formulierung.

[0022] Modifikationen von OPG-Polypeptiden sind durch die Erfindung umfaßt und schließen posttranslationale Modifikationen (z. B. N-verknüpfte oder O-verknüpfte Kohlenhydratketten, Prozessierung N- oder C-terminaler Enden), Anheftung von chemischen Einheiten an das Aminosäuregerüst, chemische Modifikationen N- oder O-verknüpfter Kohlenhydratketten und Addition eines N-terminalen Methioninrestes infolge einer Expression in prokaryotischen Wirtszellen ein. Die Polypeptide können auch mit einer nachweisbaren Markierung modifiziert werden, wie einen enzymatischen Marker, fluoreszenten Marker, Isotopen- oder Affinitätsmarker, um eine Detektion und Isolierung des Proteins zu ermöglichen.

[0023] Weitere Modifikationen von OPG schließen OPG-Chimäre oder Fusionsproteine von OPG ein, wobei OPG an eine heterologe Aminosäuresequenz fusioniert wird. Die heterologe Sequenz kann irgendeine Sequenz sein, die es erlaubt, dass das entstehende Fusionsprotein die OPG-Aktivität behält. Die heterologen Sequenzen umfassen z. B. Immunoglobulinfusionsproteine, wie Fc-Fusionsproteine, die bei der Reinigung des Proteins nützlich sein können. Eine heterologe Sequenz, die die Zusammenlagerung von OPG-Monomeren zu Dimeren, Trimeren oder höheren Multimeren fördert, ist bevorzugt.

[0024] In einer Ausführungsform umfaßt ein chimäres OPG-Protein eine Fusion eines verkürzten OPG-Polypeptids mit einer Fc-Region humaner IgG. Verkürzungen von OPG können an Amino- oder Carboxytermini oder an beiden auftreten, und bevorzugt sind Verkürzungen von bis zu 216 Aminosäuren vom Carboxyterminus bei Rest 401. Eine Fusion an eine Fc-Region kann zwischen dem Carboxyterminus einer Fc-Region und dem Aminoterminus eines verkürzten OPG-Polypeptids oder alternativ zwischen dem Aminoterminus einer Fc-Region und dem Carboxyterminus eines verkürzten OPG-Polypeptids auftreten. Beispiele verkürzter OPG-Polypeptide, die an eine Fc-Region fusioniert sind, schließen die Reste 22-185, 22-189, 22-194 oder 22-201 ein, wie in SEQ ID NR. 1 gezeigt oder Varianten davon.

[0025] Die Polypeptide dieser Erfindung werden isoliert und von anderen Polypeptiden, die in OPG exprimierenden Geweben, Zelllinien und transformierten Wirtszellen vorkommen, gereinigt oder von Bestandteilen in Zellkulturen gereinigt, die das sezernierte Protein enthalten. In einer Ausführungsform ist das Polypeptid nicht mit anderen humanen Proteinen assoziiert, wie das Expressionsprodukt einer bakteriellen Wirtszelle.

[0026] Die Erfindung liefert auch chemisch modifizierte OPG-Derivate, die zusätzliche Vorteile liefern können, wie eine gesteigerte Stabilität und Zirkulationsdauer des Peptids oder verminderte Immunogenität (siehe U. S. Patent Nr. 4,179,337). Die chemischen Einheiten für eine Derivatisierung können aus wasserlöslichen Polyme-

ren, wie Polyäthylenglykol, Äthylenglykol/Propylenglykol-Copolymeren, Carboxymethylzellulose, Dextran, Polyvinylalkohol und Ähnlichen ausgewählt werden. Die Polypeptide können an zufälligen Orten innerhalb des Moleküls modifiziert werden oder an vorbestimmten Positionen innerhalb des Moleküls und können eine, zwei, drei oder mehr angeheftete chemische Einheiten einschließen.

[0027] Das Polymer kann irgendein Molekulargewicht aufweisen und kann verzweigt oder unverzweigt vorliegen. Für Polyäthylenglykol liegt das bevorzugte Molekulargewicht zwischen ungefähr 1 kDa und ungefähr 100 kDa (der Ausdruck „ungefähr“ zeigt an, dass in Polyäthylenglykollösungen einige Moleküle mehr, andere weniger als das genannte Molekulargewicht wiegen) für eine leichte Handhabung und Herstellung. Andere Größen können in Abhängigkeit vom gewünschten therapeutischen Profil verwendet werden (z. B. die gewünschte Dauer der anhaltenden Freisetzung, der Wirkungen, falls überhaupt vorhanden, auf die biologische Aktivität, die Einfachheit der Handhabung, der Grad oder das Fehlen von Antigenizität und andere bekannte Wirkungen von Polyäthylenglykol auf ein therapeutisches Protein oder Analogon).

[0028] Die Polyäthylenglykol-Moleküle (oder andere chemische Einheiten) sollten unter Berücksichtigung der Effekte auf funktionale und antigene Domänen des Proteins an das Protein angeheftet sein. Es gibt eine Vielzahl von Anheftungsverfahren, die dem Fachmann auf seinem Gebiet verfügbar sind, z. B. EP 401 384 (Kopplung von PEG an G-CSF), hier durch den Bezug darauf aufgenommen, siehe auch Malik et al., Exp. Hematol. 20: 1028-1035 (1992) (Bericht über Pegylierung von GM-CSF unter Verwendung von Tressylchlorid). Polyäthylenglykol kann z. B. kovalent über eine reaktive Gruppe an Aminosäurereste, wie eine freie Amino- oder Carboxylgruppe, gebunden werden. Reaktive Gruppen sind solche, an die ein aktiviertes Polyäthylenglykolmolekül gebunden werden kann. Die Aminosäurereste, die eine freie Aminogruppe aufweisen, können Lysinreste und N-terminale Aminosäurereste einschließen; solche, die eine freie Carboxylgruppe aufweisen können, schließen Asparaginsäurereste, Glutaminsäurereste und C-terminale Aminosäurereste ein. Sulfhydrylgruppen können auch als reaktive Gruppen zur Anheftung von dem(n) Polyäthylenglykolmolekülen) verwendet werden. Für therapeutische Zwecke ist ein Anhängen an eine Aminogruppe, wie den N-Terminus oder eine Lysingruppe bevorzugt.

[0029] Die Erfindung stellt auch am Aminoterminus selektiv chemisch modifiziertes OPG bereit. Bei Verwendung von Polyäthylenglykol, zur Veranschaulichung der vorliegenden Zusammensetzungen, kann man aus einer Vielfalt von Polyäthylenglykolmolekülen auswählen (anhand des Molekulargewichtes, Verzweigung, etc.), dem Verhältnis von Polyäthylenglykolmolekülen zu Protein- oder Peptid-Molekülen in der Reaktionsmischung, der Art der Pegylierungsreaktion, die durchgeführt werden soll, und dem Verfahren, mit dem selektiv N-terminal pegylierte Proteine gewonnen werden sollen. Das Verfahren zum Erhalt eines N-terminaler pegylierten Präparats (d. h., falls nötig, Trennung dieser Einheit von anderen monopegylierten Einheiten) kann eine Reinigung des N-terminal pegylierten Materials aus einer Population pegylierter Proteinmoleküle sein. Eine selektive N-terminale chemische Modifizierung kann durch reduktive Alkylierung durchgeführt werden, die eine differentielle Reaktivität der verschiedenen primären Aminogruppen (Lysin- versus N-terminal), die für eine Derivatisierung in einem besonderen Protein zur Verfügung stehen, ausnutzt. Unter geeigneten Reaktionsbedingungen wird eine im Wesentlichen selektive Derivatisierung des Proteins am N-Terminus mit einer Carbonylgruppe, die das Polymer enthält, erreicht.

[0030] Diese Erfindung liefert auch ein OPG-Multimer, das OPG-Monomere umfaßt. OPG scheint als Multimer (z. B. Dimer, Trimer oder eine größere Anzahl an Monomeren) aktiv zu sein. Vorzugsweise sind OPG-Multimere Dimere oder Trimere. OPG-Multimere können Monomere umfassen, die die OPG-Aminosäuresequenz aufweisen, die ausreicht, um die Multimerbildung zu fördern oder können Monomere umfassen, die heterologe Sequenzen, wie eine Antikörper-Fc-Region, aufweisen. Eine Analyse carboxyterminaler Deletionen von OPG legt nahe, dass mindestens ein Anteil der Region 186-401 an der Zusammenlagerung von OPG-Polypeptiden beteiligt ist. Eine Ersetzung eines Teils oder der gesamten Region der OPG-Aminosäuren 186-401 mit einer Aminosäuresequenz, die zur Selbst-Zusammenlagerung befähigt ist, ist durch die vorliegende Erfindung ebenfalls mit eingeschlossen. Alternativ können OPG-Polypeptide oder Derivate davon so modifiziert werden, dass sie Dimere oder Multimere bilden, und zwar durch „site-directed mutagenesis“, um ungepaarte Cysteinreste zu bilden, damit innerhalb der Ketten eine Disulfidbindung entsteht, durch photochemisches Vernetzen, wie durch UV-Licht oder durch chemisches Vernetzen mit bifunktionalen Linkermolekülen, wie bifunktionales Polyäthylenglykol und Ähnliche. In einer Ausführungsform werden OPG-Multimere durch eine kovalente Verknüpfung von OPG-Monomeren, denen einen Teil oder die gesamte Region mit den Aminosäuren 186-401 fehlt, gebildet, so dass die Zusammenlagerung der OPG-Monomere weitgehend über eine Modifizierung innerhalb der verknüpfenden Gruppe stattfindet.

[0031] OPG-Multimere können mit verschiedenen chemischen Vernetzungs-Verfahren hergestellt werden.

OPG-Monomere können in jeglicher Weise chemisch verknüpft werden, die die biologische Aktivität von OPG erhält oder steigert. Eine Vielfalt chemischer Vernetzungsreagenzien kann verwendet werden, je nach dem, welche Eigenschaften das Proteindimer aufweisen soll. Vernetzungsreagenzien können z. B. kurz und relativ starr oder länger und flexibler sein, können biologisch reversibel sein und können einer verminderten Immunogenität oder verlängerten pharmakokinetischen Halbwertszeit aufweisen.

[0032] OPG-Moleküle werden über den Aminoterminal mit einem zweistufigen Verfahren verknüpft, wobei OPG am Aminoterminal chemisch modifiziert wird, um eine geschützte Thiolgruppe einzuführen, dessen Schutzgruppe nach der Reinigung entfernt wird und als Anheftungsstelle für eine ortsspezifische Konjugation unter Anwendung einer Vielfalt an Vernetzungsreagenzien mit einem zweiten OPG-Molekül verwendet wird. Aminoterminal Vernetzungsreagenzien schließen eine Disulfidbindung, Thioätherverbindungen, unter Verwendung von kurzkettigen, bifunktionalen, aliphatischen Vernetzungsreagenzien und Thioätherverbindungen mit biofunktionalen Polyäthylenglykol-Vernetzungsreagenzien variabler Länge (PEG-„Hanteln“) ein, sind aber nicht auf diese beschränkt. Ebenfalls durch die PEG-„Hantel“-Synthese von OPG-Dimeren ebenfalls umfaßt ist ein Beiprodukt einer solchen Synthese, „Mono-Hantel“ genannt. Eine OPG-„Mono-Hantel“ besteht aus einem Monomer, das an ein lineares, bifunktionales PEG mit einem freien Polymerterminus gekoppelt ist. Alternativ kann OPG direkt mittels einer Vielzahl aminspezifischer homobifunktionaler Vernetzungstechniken vernetzt werden, die Reagenzien einschließen, wie: Diäthylentriaminpentaessigsäure-Dianhydride (DTPA), p-Benzoquinon (pBQ) oder bis(Sulfosuccinimidyl)-Suberat (BS3), so wie andere, die dem Fachmann bekannt sind. Es ist auch möglich, OPG mit Reagenzien wie Iminothiolan in der Gegenwart einer Vielzahl von bifunktionalen thiol-spezifischen Vernetzungsreagenzien, wie PEG-Bismaleimid, direkt in ein Thiolat zu überführen, und damit eine Dimerisierung und/oder „Hanteln“ mit einem einstufigen Verfahren zu gewinnen.

[0033] OPG-Multimere können auch durch Verknüpfen von OPG-Monomeren mit Peptiden unterschiedlicher Länge gebildet werden. Die Peptide werden so ausgewählt, dass sie eine Aminosäuresequenz und Zusammensetzung aufweisen, die als flexibler Linker zwischen den OPG-Monomeren wirken können. Peptidlinker können Monomere „Kopf-an-Kopf“ verbinden (N-terminal an N-terminal oder C-terminal an C-terminal) oder „Kopf-an-Schwanz“ (N-terminal an C-terminal). Peptidlinker weisen bevorzugt ungefähr 15-60 Aminosäuren in der Länge auf.

[0034] Ein Verfahren zur OPG-Reinigung aus natürlichen Quellen und aus transfizierten Wirtszellen ist ebenfalls hier mit eingeschlossen. Das Reinigungsverfahren kann ein oder mehrere Standard-Proteinreinigungsschritte in geeigneter Reihenfolge verwenden, um das gereinigte Protein zu erhalten. Die Chromatographieschritte können Ionenaustausch, Gelfiltration, hydrophobe Interaktion, "Reversed Phase", Chromatofokussierung, Affinitätschromatographie unter Verwendung eines anti-OPG-Antikörpers oder eines Biotin-Streptavidin-Affinitätskomplexes und Ähnliche mit einschließen.

Nukleinsäuren

[0035] Nukleinsäuremoleküle, die für OPG-Polypeptide dieser Erfindung kodieren, werden ebenfalls bereitgestellt. Die Nukleinsäuremoleküle werden aus folgenden ausgewählt:

- a) Die Nukleinsäuresequenz, wie in SEQ ID NR. 1 dargestellt oder der komplementäre Strang dazu;
- b) die Nukleinsäuren, die unter stringenten Bedingungen mit der für das Polypeptid kodierenden Region in SEQ ID NR. 1 hybridisieren; und
- c) die Nukleinsäuresequenzen mit degeneriertem Code zu den Sequenzen in (a) und (b)

[0036] Im Allgemeinen sind Hybridisierungsbedingungen solche mit hoher Stringenz, wie 5x SSC, 50% Formamid und 42°C verwendet oder ein Äquivalent davon, das einfach durch eine Anpassung der Salzkonzentrationen und Konzentrationen an organischem Lösungsmittel sowie der Temperatur erhalten werden kann. Zustände äquivalenter Stringenz können z. B. auch durch einen Anstieg der Temperatur während der Hybridisierung oder des Waschschrittes (in einem Bereich von 50 – 65°C) und durch eine Abnahme der Salzkonzentration (in einem Bereich von 1 – 0.2x SSC) bei gleichzeitigem Weglassen des organischen Lösungsmittels erreicht werden. Hybridisierungsbedingungen für Nukleinsäuren sind detaillierter in Sambrook et al., Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 2. Auflage. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York (1989) beschrieben.

[0037] Die Länge der hybridisierenden Nukleinsäuren der Erfindung kann variieren, da die Hybridisierung in einem Teil oder der gesamten für das Polypeptid-kodierenden Region, wie in SEQ ID NR. 1 gezeigt, stattfinden kann, und da sie ebenfalls in benachbarten, nicht-kodierenden Regionen erfolgen kann. Hybridisierende Nukleinsäuren können kürzer oder länger als die in SEQ ID NR. 1 gezeigte komplementäre Sequenz sein. Verkürz-

te oder verlängerte Nukleinsäuren, die mit der SEQ ID NR. 1 hybridisieren, können eine oder mehrere der biologischen Eigenschaften von OPG behalten, wie anti-resorptive Aktivität gegenüber Knochen oder Schutz vor arterieller Verkalkung. Die hybridisierenden Nukleinsäuren können auch benachbarte, nicht-kodierende Regionen einschließen, die 5' und/oder 3' in Bezug auf die OPG-kodierende Region liegen. Die nicht-kodierenden Regionen schließen regulatorische Regionen ein, die an der OPG-Expression beteiligt sind, wie Promotoren, „Enhancer“, Translations-Startpunkte, Transkriptions-Endpunkte und Ähnliche.

[0038] Die Erfindung liefert ebenfalls Derivate der in SEQ ID NR. 1 gezeigten Nukleinsäuresequenzen. Derivate, so wie hier verwendet, schließen Nukleinsäuresequenzen mit Additionen, Substitutionen, Insertionen oder Deletionen von einem oder mehreren Resten sein, so dass die resultierenden Sequenzen für Polypeptide kodieren, bei denen ein oder mehrere Aminosäurereste addiert, entfernt, inseriert oder substituiert wurden, und das resultierende Polypeptid OPG-Aktivität aufweist, wie antiresorptive Aktivität gegenüber Knochen oder Schutz vor arterieller Verkalkung. Die Nukleinsäurederivate können natürlich vorkommen, wie durch unterschiedliches „Splicen“ oder durch einen Polymorphismus oder können mittels dem Fachmann bekannten „site-directed mutagenesis“-Verfahren hergestellt werden. Ein Beispiel für eine natürlich vorkommende OPG-Variante ist eine Nukleinsäure, die an Position 3 der „Leadersequenz“ für ein Lys anstelle für ein Asn kodiert (siehe WO 97/23614). Es wird erwartet, dass Nukleinsäurederivate für Aminosäureänderungen kodieren, die mit der geringsten Wahrscheinlichkeit die biologische Aktivität in der jeweiligen Region des Moleküls unterbinden.

[0039] In einer Ausführungsform schließen OPG-Derivate Nukleinsäuren ein, die für verkürzte Formen der Gesamtlängen-OPG-Sequenz kodieren (Gesamtlängen-OPG umschließt die Reste 22 bis 401 der SEQ ID Nr. 1) und denen eine oder mehrere Aminosäuren vom Carboxyterminus entfernt wurden. Von Nukleinsäuren, die für OPG kodieren, können bis zu ungefähr 216 Aminosäuren vom Carboxyterminus entfernt worden sein. Optional kann eine Antikörper-Fc-Region den neuen Carboxyterminus des verkürzten OPGs verlängern, um ein biologisch aktives OPG-Fc-Fusionspolypeptid zu bilden oder eine Fc-Region kann an den Aminoterminus des verkürzten OPGs gehängt werden. In bevorzugten Ausführungsformen kodieren Nukleinsäuren für OPG mit den Aminosäureresten 22-185, 22-189, 22-194 oder 22-201 (bei Verwendung der Nummerierung in SEQ ID NR. 1) und optional kodieren sie für eine Fc-Region humaner IgG.

[0040] Ebenfalls hier mit eingeschlossen sind Nukleinsäuren, die für verkürzte OPG-Formen kodieren, bei denen ein oder mehrere Aminosäuren am Aminoterminus entfernt wurden. Verkürzte Formen schließen solche ein, denen ein Teil oder sämtliche 21 Aminosäuren fehlen, die die „Leadersequenz“ umfassen. Dem reifen OPG fehlen sämtliche der 21 Aminosäuren der „Leadersequenz“. Weiterhin liefert die Erfindung Nukleinsäuren, die für OPG kodieren, dem 1 bis 10 Aminosäuren vom reifen Aminoterminus (am Rest 22) und, optional, 1 bis 216 Aminosäuren vom Carboxyterminus (am Rest 401) entfernt wurden. Optional können die Nukleinsäuren für einen Methioninrest am Aminoterminus kodieren.

[0041] Beispiele für Nukleinsäuren der Erfindung schließen cDNA, genomische DNA, synthetische DNA und RNA ein. Die cDNA wird aus Bibliotheken gewonnen, die mit mRNA, isoliert aus verschiedenen OPG exprimierenden Geweben, hergestellt wurden. Menschliche Gewebequellen für OPG schließen Niere, Leber, Plazenta und Herz ein. Genomische DNA, die für OPG kodiert, wird aus genomischen Bibliotheken gewonnen, die für eine Vielzahl an Arten kommerziell erhältlich sind. Synthetische DNA wird mittels chemischer Synthese von überlappenden Oligonukleotidfragmenten erhalten, gefolgt von einem Zusammensetzen der Fragmente, um einen Teil oder die gesamte kodierende Region und flankierende Sequenzen wiederherzustellen (siehe U.S. Patent Nr. 4,695,623, das die chemische Synthese von Interferongen beschreibt). Die RNA wird am einfachsten mittels prokaryotischer Expressionsvektoren erhalten, die die mRNA-Synthese auf hohem Niveau steuern, wie Vektoren, die T7 Promotoren und RNA Polymerase verwenden.

Vektoren und Wirtszellen

[0042] Expressionsvektoren, die für OPG kodierende Nukleinsäuresequenzen enthalten, Wirtszellen, die mit den genannten Vektoren transformiert wurden und Verfahren zur Herstellung von OPG werden ebenfalls durch die Erfindung bereitgestellt. Einen Überblick über die Expression rekombinanter Proteine gibt: *Methods in Enzymology* v. 185, Goeddel, D. V. Ed. Academic Press (1990).

[0043] Wirtszellen zur Herstellung von OPG schließen prokaryotische Wirtszellen, wie E. coli, Hefe, Insekten- und Säugetierwirtszellen ein. E. coli-Stämme, wie HB101 oder JM101, sind für eine Expression geeignet. Bevorzugte Säugetierwirtszellen schließen COS, CHOd-, 293, CV-1, 3T3, Babyhamster-Nierenzellen (BHK) und andere ein. Säugetierwirtszellen sind bevorzugt, wenn posttranslationale Modifikationen, wie Glykosylierung und Prozessierung des Polypeptids für eine OPG-Aktivität wichtig sind. Eine Expression in Säugetierzellen er-

laubt die Herstellung sezernierter Polypeptide, die aus dem Nährmedium wiedergewonnen werden können.

[0044] Vektoren für die OPG-Expression enthalten mindestens Sequenzen, die für die Vektorvermehrung und für die Expression des klonierten Inserts erforderlich sind. Diese Sequenzen schließen einen Replikationsursprung, einen Selektionsmarker, einen Promotor, eine ribosomale Bindungsstelle, „Enhancer-Sequenzen“, „RNA-Splice-sites“ und Orte für einen Stop der Transkription ein. Für eine Expression in den zuvor genannten Wirtszellen sind die Vektoren leicht verfügbar, und die Nukleinsäuren dieser Erfindung werden in die Vektoren mittels rekombinanter DNA-Standardtechniken eingefügt. Vektoren für eine gewebespezifische OPG-Expression sind ebenfalls mit eingeschlossen. Solche Vektoren schließen Promotoren ein, die für eine spezifische Produktion in der Leber, Niere oder anderen Organen von Mäusen geeignet sind sowie virale Vektoren für die OPG-Expression in humanen Zielzellen.

[0045] Bei Anwendung eines geeigneten Wirt-Vektor-Systems wird OPG durch die Kultur einer mit einem Expressionsvektor transformierten Wirtszelle rekombinant hergestellt, wobei der Expressionsvektor für OPG kodierende Nukleinsäuresequenzen enthält, die für OPG unter den Bedingungen kodieren, dass OPG produziert wird und anschließend das Expressionprodukt isoliert werden kann. OPG wird in den Überstand transfizierter Säugetierzellen oder in „inclusion bodies“ transformierter bakterieller Wirtszellen produziert. Das so hergestellte OPG kann durch dem Fachmann bekannte Verfahren, wie weiter unten beschrieben, gereinigt werden. Die OPG-Expression in Säugetier- und bakteriellen Wirtssystemen ist in W097/23614 beschrieben. Expressionsvektoren für Säugetierwirtszellen sind beispielsweise Plasmide wie pDSR α , siehe W090/14364. Expressionsvektoren für bakterielle Wirtszellen sind beispielsweise die Plasmide pAMG21 und pAMG22-His, wie in W097/23614 beschrieben. Die hier beschriebenen besonderen Plasmide und Wirtszellen dienen illustrativen Zwecken, und andere Plasmide und Wirtszellen können auch zur Expression der Polypeptide verwendet können.

[0046] Die Erfindung berücksichtigt auch eine OPG-Expression aus endogenen Nukleinsäuren durch in vivo und ex vivo Rekombinationsereignisse. Ein Verfahren verwendet die Aktivierung eines normalerweise stillen endogenen OPG-Gens durch die Einführung exogener regulatorischer Sequenzen (z. B. Promotoren oder „Enhancer“), die geeignet sind, die OPG-Expression vom endogenen Gen oder von einer Genvariante davon, die in dem Wirtsgenom vorliegt oder durch die Einführung exogener Sequenzen hergestellt wird, zu steuern. Normalerweise liegen exogene Sequenzen auf Vektoren, die zur homologen Rekombination mit dem Wirtsgenom befähigt sind. Weiterhin können endogene und exogene regulatorische Sequenzen, die geeignet sind die OPG-Produktion zu steuern, aktiviert oder stimuliert werden, um OPG nach Exposition mit bestimmten, die Transkription und/oder Translation aktivierenden oder stimulierenden Faktoren, zu steuern.

Pharmazeutische OPG Zusammensetzungen

[0047] Pharmazeutische OPG Zusammensetzungen enthalten normalerweise eine therapeutisch wirksame Menge an OPG-Protein-Produkt in einer Mischung mit einem oder mehreren pharmazeutisch und physiologisch akzeptablen Formulierungsstoffen. Solche Formulierungsstoffe schließen ein, sind aber nicht beschränkt auf: Antioxidantien, Konservierungsmittel, färbende, aromagebende und verdünnende Reagenzien, Emulgatoren, suspendierende Reagenzien, Lösungsmittel, Füllmittel, Quellmittel, Puffer, Vehikel für die Freisetzung, Verdünnungsmittel, Hilfsstoffe, und/oder pharmazeutische Adjuvantien. Ein geeignetes Vehikel kann z. B. Wasser für eine Injektion sein oder physiologische Salzlösung oder andere Materialien, die in Zusammensetzungen für eine parenterale Verabreichung gebräuchlich sind. Eine neutrale, gepufferte Salzlösung oder eine Salzlösung, gemischt mit Serumalbumin, sind weitere beispielhafte Vehikel.

[0048] Das wichtigste Lösungsmittel in einem Vehikel kann entweder wässriger oder nicht-wässriger Natur sein. Weiterhin kann das Vehikel andere pharmazeutisch akzeptable Hilfsstoffe enthalten, um den pH-Wert, die Osmolarität, die Viskosität, die Klarheit, die Farbe, die Sterilität, die Stabilität, die Auflösungsgeschwindigkeit oder den Geruch der Formulierung zu modifizieren oder zu erhalten. In ähnlicher Weise kann das Vehikel noch weitere pharmazeutisch-akzeptable Hilfsmittel enthalten, um die Stabilität, die Auflösungsgeschwindigkeit oder die Freisetzungsgeschwindigkeit von OPG zu modifizieren oder zu erhalten. Diese Hilfsstoffe sind solche Substanzen, die üblicherweise verwendet werden, um Dosierungen für eine parenterale Verabreichung, entweder für eine Einzeldosis oder eine multiple Dosis, zu formulieren.

[0049] Sobald eine therapeutische Zusammensetzung formuliert wurde, kann sie in sterilen Gefäßen als Lösung, Suspension, Gel, Emulsion, Feststoff oder dehydriertes oder lyophilisiertes Pulver aufbewahrt werden. Solche Formulierungen können entweder in einer sofort verwendbaren Form oder in einer Form, z.B., lyophilisiert, gelagert werden, die eine Rekonstitution vor Verabreichung erforderlich machen.

[0050] Die optimale pharmazeutische Formulierung wird durch den Fachmann in Abhängigkeit von der Route der Verabreichung und der gewünschten Dosis bestimmt werden. Siehe z. B. Remington's Pharmaceutical Sciences, 18. Auflage (1990, Mack Publishing Co., Easton, PA 18042, Seiten 1435-1712), der Inhalt ist hier durch Referenz darauf aufgenommen.

[0051] Andere wirksame Arten der Verabreichung, wie parenterale, langsam freisetzende Formulierungen, inhalierbare Nebel, oral aktive Formulierungen oder Suppositorien werden ebenfalls in Betracht gezogen. In einer Ausführungsform werden die pharmazeutischen OPG-Zusammensetzungen für eine parenterale Verabreichung formuliert. Solche parenteral verabreichten therapeutischen Zusammensetzungen liegen typischerweise in einer pyrogenfreien, parenteral akzeptablen wässrigen Lösung vor, die OPG in einem pharmazeutisch akzeptablen Vehikel umfaßt. Ein bevorzugtes Vehikel ist physiologische Salzlösung.

[0052] Zusammensetzungen für eine anhaltende Freisetzung und/oder Abgabe von OPG umfassen OPG-Polypeptide, die mit wasserlöslichen Polymeren modifiziert wurden, wie oben beschrieben, um die Löslichkeit oder Stabilität zu erhöhen. Die Zusammensetzungen können auch die Einlagerung von OPG in Liposomen, Mikroemulsionen oder Vesikeln für eine kontrollierte Freisetzung über einen ausgedehnten Zeitraum umfassen. Insbesondere können OPG-Zusammensetzungen die Einlagerung in Polymermatrizes umfassen, wie Hydrogele, Silikone, Polyäthylene, Äthylvinylacetat-Copolymere oder biologisch abbaubare Polymere. Beispiele für Hydrogele schließen Polyhydroxy-Alkylmethacrylates (pHEMA), Polyacrylamid, Polymethacrylamid, Polyvinylpyrrolidon, Polyvinylalkohol und verschiedene Polyelektrolytkomplexe ein. Beispiele für biologisch abbaubare Polymere schließen Polymilchsäure (PLA), Polyglykolsäure (PGA), Copolymere von PLA und PGA, Polyamide und Copolymere von Polyamiden und Polyestern ein. Andere Formulierungen für eine kontrollierte Freisetzung schließen Mikrokapseln, Mikrokügelchen, makromolekulare Komplexe und Polymerperlen ein, die mittels Injektion verabreicht werden können. Hyaluronsäure kann auch verwendet werden und dabei so wirken kann, dass eine längere Verweildauer im Blutkreislauf gefördert wird. Solche Zusammensetzungen können den physikalischen Zustand, die Stabilität, die Rate der Freisetzung in vivo und die Rate der in vivo „clearance“ der vorhandenen Proteine und Derivate beeinflussen.

[0053] Ebenfalls in Erwägung gezogen wird, dass bestimmte OPG-enthaltende Formulierungen oral verabreicht werden. OPG, das in dieser Weise verabreicht wird, kann in einer Kapsel eingeschlossen sein und kann mit oder ohne Träger, die üblicherweise beim Herstellen fester Dosierungsformen verwendet werden, formuliert werden. Die Kapsel kann so geformt sein, dass sie den aktiven Teil der Formulierung zu dem Zeitpunkt in den gastrointestinalen Trakt freisetzt, an dem die Bioverfügbarkeit maximal ist und ein präsystemischer Abbau minimiert ist. Zusätzliche Hilfsstoffe können eingeschlossen sein, um die Absorption zu erleichtern. Verdünnungsmittel, Aromastoffe, bei niedrigen Temperaturen schmelzende Wachse, pflanzliche Öle, Gleitmittel, suspendierende Reagenzien, Reagenzien zur Auflösung der Tablette und Bindemittel können ebenfalls verwendet werden.

Verabreichung von OPG

[0054] OPG-Polypeptide können parenteral auf subkutaner, intramuskulärer, intravenöser, transpulmonaler oder transdermaler Route verabreicht werden. Um die gewünschte OPG-Dosis zu erreichen, können wiederholt tägliche oder weniger häufige Injektionen verabreicht werden. Die Häufigkeit der Dosierung wird von den pharmakokinetischen Parametern des auf bestimmte Weise formulierten OPG-Polypeptids und der Route der Verabreichung abhängen.

[0055] Unabhängig von der Art und Weise der Verabreichung wird die spezifische Dosis normalerweise gemäß dem Körpergewicht und der Körperoberfläche berechnet. Weitere genauere Berechnungen, die nötig wären, um die geeignete Dosierung für eine Behandlung zu berechnen, die jede der oben genannten Formulierungen betrifft, wird durch Fachleute routinemäßig erfolgen, insbesondere in Hinblick auf die Informationen, die hier bezüglich der Dosierung und Tests gegeben werden. Geeignete Dosierungen können mittels Verwendung etablierter Tests zur Dosisbestimmung, die in Verbindung mit geeigneten Dosis-Antwort-Daten verwendet werden, ermittelt werden. Das Dosis-Regimen, das letztlich in einem Verfahren zur Behandlung von einem bestimmten Zustand eingesetzt wird, kann durch einen anwesenden Mediziner bestimmt werden, der verschiedene Faktoren berücksichtigt, die die Wirkung von Medikamenten beeinflussen, wie Alter, Zustand, Körpergewicht, Geschlecht und Diät des Patienten, den Schweregrad jeglicher Infektion, den Zeitpunkt der Verabreichung und andere klinische Faktoren. In einer Ausführungsform liegt der Dosierungsbereich für ein Fc-OPG-Fusionsprotein, bei dem der Carboxyterminus einer Fc-Region an einen aminoterminalen Rest eines verkürzten OPG-Polypeptids verknüpft wurde (z. B. Fc-OPG [22-194]), bei ungefähr 10 µg/kg bis ungefähr 10 mg/kg.

[0056] Eine in vivo Gentherapie mit OPG wird ebenfalls in Betracht gezogen, wobei eine Nukleinsäuresequenz, die für OPG kodiert, ein Derivat davon oder ein chimäres OPG-Protein direkt in den Patienten eingebracht wird. Z. B. wird eine Nukleinsäuresequenz, die für ein OPG-Polypeptid kodiert, wird über eine lokale Injektion eines Nukleinsäurekonstrukts, mit oder ohne einen geeigneten Freisetzungsvektor, wie ein Adenovirus-assoziiierter Virusvektor, in die Zielzellen hineingebracht. Alternative virale Vektoren schließen Retroviren-, Adenoviren-, Herpes simplex Virus- und Papillomaviren-Vektoren ein, sind aber nicht auf diese beschränkt. Der physikalische Transfer kann in vivo über eine lokale Injektion des gewünschten Nukleinsäurekonstrukts oder eines anderen geeigneten Freisetzungsvektors, der die gewünschte Nukleinsäuresequenz enthält, einen Liposomen-vermittelter Transfer, eine direkte Injektion (nackte DNA), einen Rezeptor-vermittelten Transfer (Liganden-DNA-Komplex) oder ein Mikropartikel-Bombardement („gene gun“) erreicht werden.

[0057] Atherosklerose verursacht die meisten degenerativen arteriellen Erkrankungen, und eine Verkalkung der Arterienwand tritt normalerweise in klinisch signifikanten Läsionen auf. Eine Verengung und ein Verschuß der Arterie sind die häufigsten gemeinsamen Eigenschaften der Krankheit, obwohl die Stärke der Arterienwand auch durch einem Verlust an Elastin und Kollagen beeinträchtigt sein kann. Die Folgen eines arteriellen Verschlusses schließen Durchtrennung, Aneurysmen, Ischämie, Thrombose und akute sowie chronische Herzerkrankungen ein. In vielen Fällen sind chirurgische und angioplastische Behandlungen erforderlich, und solche Behandlungen sind notwendigerweise invasiv, um wirksam zu sein, verhindern nicht die Verstopfung an anderen arteriellen Orten, und in einigen Fällen ist es erforderlich, die Behandlung am Ausgangsort (z. B. bei Restenose) zu wiederholen.

[0058] OPG kann verwendet werden, um Artherosklerose und Arteriosklerose Typ Mönckeberg („medial calcific sclerosis“) zu behandeln sowie andere Zustände, die durch eine arterielle Verkalkung charakterisiert sind. OPG kann alleine oder in Kombination mit anderen Medikamenten, wie blutdrucksenkende und cholesterinsenkende Medikamente, zur Behandlung von Artherosklerose verabreicht werden. Blutdrucksenkende Medikamente schließen Diuretika, α -adrenerge hemmende Medikamente, β -adrenerge hemmende Medikamente, Hemmstoffe der Calciumaufnahme, Hemmstoffe des „Angiotensin converting enzyme“ und gefäßerweiternde Medikamente ein. Cholesterinsenkende Medikamente, die den Spiegel des „low density lipoprotein (LDL)“ erniedrigen, schließen Gallensäure-Chelatbildner, HMG-CoA-Reduktase-Inhibitoren, Fibrinsäurederivate und Nikotinsäure ein. OPG kann auch mit anti-resorptiven Wirkstoffen, die einen positiven kardiovaskulären Effekt ausüben können, verabreicht werden, wie z. B. Hormone (Östrogene), Vitamin D und Vitamin D-Derivate und selektive Östrogen-Rezeptor-Modulatoren (SERMs), wie Raloxifen (EVISTA). Weiterhin kann OPG in Zusammenhang mit chirurgischen und angioplastischen Behandlungen, wie arterielle Prothese und Ballon-Angioplastie, verabreicht werden.

[0059] Die Erfindung wird umfassender durch Bezugnahme auf die folgenden Beispiele verstanden. Diese Beispiele sind nicht so gewählt, dass sie in irgendeiner Weise die Reichweite der Erfindung begrenzen.

Beispiel 1

Analyse der OPG-Expression mittels in situ Hybridisierung

[0060] Die Herstellung der Embryonen und Gewebe für die in situ Hybridisierungsexperimente und die Herstellung der radioaktiv markierten Oligonukleotidsonden zur Detektion der OPG-mRNA-Spiegel wurde bei Simonet et al. supra beschrieben. Die Lokalisierung hoher Spiegel an OPG mRNA im anfänglichen Teil der Aorta in einem 18.5 Tage alten Maus-Embryo ist in den [Abb. 1A-Abb. 1D](#) gezeigt. Die OPG-Expression in der adulten Ratte ist auch in der glatten Muskelzellwand der renalen Arterie vorhanden, wie in den [Abb. 2A-Abb. 2E](#) gezeigt.

Beispiel 2

Herstellung von OPG „knockout“ Mäusen

[0061] Die Verfahren zur Herstellung von OPG-„knockout“-Mäusen, einschließlich der Herstellung von Vektoren, um die OPG-Sequenzen gezielt in das Mausgenom zu integrieren, und die Einführung der genannten Vektoren in die Mausembryonen sind in einem anhängigen und in Mitbesitz befindlichen U.S. Patent mit der Seriennummer 08/943,687 beschrieben.

Beispiel 3

Phänotypische Analyse der OPG-„knockout“-Mäuse

[0062] Gruppen homozygoter OPG-„knockout“-Mäuse (OPG^{-/-}), heterozygoter „knockout“-Mäuse (OPG^{+/-}) und Kontrollmäuse (OPG^{+/+}) wurden am Tag E18, und 7, 14, 60 und 180 Tage postnatal getötet. Eine Radiographie wurde vor Herstellung der Schnitte angefertigt. Im Serum der Mäuse wurden klinische und sämtliche hämatologischen Parameter untersucht. Der gesamte Körper und die Hauptorgane wurde gewogen und in Formalin fixiert.

[0063] Eine Zusammenfassung der Daten für die getöteten Mäuse ist in Tabelle 1 gezeigt.

TABELLE 1

Wildtypen (+/+)	Heterozygote (+/-)	Homozygote (-/-)
1-34 männlich	1-28 männlich	1-27 männlich
1-37 männlich	1-29 männlich	1-26 männlich *
1-45 männlich	1-35 männlich	1-38 männlich **
1-25 männlich	1-36 männlich	77 weiblich
81 weiblich	1-46 männlich	80 weiblich
82 weiblich	75 weiblich	86 weiblich
83 weiblich	76 weiblich	
	78 weiblich	

*OPG^{-/-} Maus 1-26 war das kleinste Tier des Geleges und ungefähr halb so groß wie eine normale Maus. Es wurde krank und starb kurz vor der geplanten Tötung. Kurz bevor es starb, zeigte es Zeichen für eine respiratorische Insuffizienz. Das Blut für die hämatologischen und Serumchemie-Bestimmungen wurde sofort nach dem Tod durch Herzpunktur gewonnen, und eine reguläre Tötung wurde durchgeführt.

**OPG^{-/-} Maus 1-38 wurde zur Vorbereitung der Maßnahmen zusammen mit der OPG^{-/-} Maus 1-27 in einen Käfig gesetzt und starb innerhalb einer Stunde vor Beginn der Tötung, es konnte kein Blut zum Testen gesammelt werden. Die weitere Autopsie wurde wie gewöhnlich durchgeführt und die Organe für die Histologie entnommen.

[0064] Die Analyse und Ergebnisse der Knochen-Morphologie, -Histologie und -Dichte, der Hämatologie und der Serumchemie-Parameter in den OPG-„knockout“-Mäusen wurde in einem anhängigen und in Mitbesitz befindlichen US-Patent mit der Seriennummer 08/943,687 beschrieben.

[0065] Zwei der drei männlichen OPG^{-/-}-Mäuse wiesen arterielle Veränderungen auf. Im Herz der Maus #26 waren schwere subendokardiale Verkalkungen vorhanden. Eine Proliferation der Intima und Verkalkungen wurden in der Aorta ([Abb. 3A](#)) und der renalen Arterie ([Abb. 3B](#)) gefunden. Der Calciumspiegel im Serum war auf 11 im Vergleich zu 8.8±0,17 in der OPG^{+/+}-Gruppe angestiegen. Die OPG-Maus^{-/-} #38 zeigte eine Proliferation der Intima und subintimal ein chronisches Granulationsgewebe im anfänglichen Teil der Aorta ([Abb. 3c](#)) und in der renalen Arterie ([Abb. 3D](#)). Der Wert für den Serumcalciumspiegel war nicht verfügbar.

[0066] Zwei der drei weiblichen OPG^{-/-}-Mäuse zeigten eine Verkalkung und eine Proliferation der Intima in der Aorta und renalen Arterie ([Abb. 4B](#), [Abb. 4C](#) und [Abb. 4D](#)), die Calciumspiegel im Serum lagen im normalen Bereich. Die dritte weibliche OPG^{-/-}-Maus zeigte eine Osteoporose im Knochen, hatte normale Calciumspiegel und keine arteriellen Veränderungen.

SEQUENZPROTOKOLL

(1) ALLGEMEINE INFORMATION:

- (i) ANMELDER: Simonet, Scott
Sarosi, Ildiko

TITEL DER ERFINDUNG: ZUSAMMENSETZUNGEN UND VERFAHREN ZUR
VERMEIDUNG UND BEHANDLUNG KARDIOVASKULÄRER ERKRANKUNGEN

- (ii) ZAHL DER SEQUENZEN: 2

- (iii) KORRESPONDENZADRESSE:

- (A) ADRESSAT: Amgen Inc.
(B) STRASSE: One Amgen Center Drive
(C) STADT: Thousand Oaks
(D) STAAT: Kalifornien
(E) LAND: USA
(F) ZIP: 91320-1789

- (iv) COMPUTER-LESBARE FORM:

- (A) MEDIUM: Diskette
(B) COMPUTER: IBM PC kompatibel
(C) BETRIEBSSYSTEM: PC-DOS/MS-DOS
(D) SOFTWARE: PatentIn Release #1.0, Version #1.30

- (v) MOMENTANE ANMELDUNGSDATEN:

- (A) ANMELDUNGSNUMMER:
(B) ANMELDEDATUM:
(C) KLASSIFIZIERUNG:

- (vi) INFORMATIONEN ZU ANWALT/KANZLEI

- (A) NAME: Winter, Robert B.
(B) REFERENZ/AKTENZEICHEN: A-525

(2) INFORMATION FÜR SEQ ID NR: 1

- (i) SEQUENZCHARAKTERISTIKA:

- (A) LÄNGE: 1355 Basenpaare
(B) TYP: Nukleinsäure
(C) STRANGTYP: Einzelstrang
(D) TOPOLOGIE: linear

- (ii) MOLEKÜLTYP: cDNA

- (ix) EIGENSCHAFT:

- (A) NAME/SCHLÜSSEL: CDS
(B) LOKALISATION: 94...1297

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NR: 1

```

GTATATATAA CGTGATGAGC GTACGGGTGC GGAGACGCAC CCGAGCGCTC GCCCAGCCGC      60
CGCTCCAAGC CCTCAGGCTT TCCGGGGACC ACA ACG AAC AAG TTG CTG TGC TGC      114
Met Asn Lys Leu Leu Cys Cys
1      5

GCG CTC GTG TTT CTG GAC ATC TCC ATT AAG TGG ACC ACC CAG GAA ACG      162
Ala Leu Val Phe Leu Asp Ile Ser Ile Lys Trp Thr Thr Gln Glu Thr
10      15      20

TTT CCT CCA AAG TAC CTT CAT TAT GAC GAA GAA ACC TCT CAT CAG CTG      210
Phe Pro Pro Lys Tyr Leu His Tyr Asp Glu Glu Thr Ser His Gln Leu

TTG TGT GAC AAA TGT CCT CCT GGT ACC TAC CTA AAA CAA CAC TGT ACA      258
Leu Cys Asp Lys Cys Pro Pro Gly Thr Tyr Leu Lys Gln His Cys Thr
40      45      50      55

GCA AAG TGG AAG ACC GTG TGC GCC CTT TGC CCT GAC CAC TAC TAC ACA      306
Ala Lys Trp Lys Thr Val Cys Ala Pro Cys Pro Asp His Tyr Tyr Thr
60      65      70

GAC AGC TGG CAC ACC AGT GAC GAG TGT CTA TAC TCC ACC CCC GTG TGC      354
Asp Ser Trp His Thr Ser Asp Glu Cys Leu Tyr Cys Ser Pro Val Cys
75      80      85

AAG GAG CTG CAG TAC GTC AAG CAG GAG TGC AAT CGC ACC CAC AAC CGC      402
Lys Glu Leu Gln Tyr Val Lys Gln Glu Cys Asn Arg Thr His Asn Arg
90      95      100

GTG TGC GAA TGC AAG GAA GGG CGC TAC CTT GAG ATA GAG TTC TGC TTC      450
Val Cys Glu Cys Lys Glu Gly Arg Tyr Leu Glu Ile Glu Phe Cys Leu
105      110      115

AAA CAT AGG AGC TGC CCT CCT GGA TTT GGA CTG GTG CAA GCT GGA ACC      498
Lys His Arg Ser Cys Pro Pro Gly Phe Gly Val Val Gln Ala Gly Thr
120      125      130      135

CCA GAG CGA AAT ACA GTT TGC AAA AGA TGT CCA GAT GGG TTC TTC TCA      546
Pro Glu Arg Asn Val Val Cys Lys Arg Cys Pro Asp Gly Phe Phe Ser
140      145      150

AAT GAG ACG TCA TCT AAA GCA CCC TGT AGA AAA CAC ACA AAT TGC AGT      594
Asn Glu Thr Ser Ser Lys Ala Pro Cys Arg Lys His Thr Asn Cys Ser
155      160      165

GTC TTT GGT CTC CTG CTA ACT CAG AAA GGA AAT GCA ACA CAC GAC AAC      642
Val Phe Gly Leu Leu Leu Thr Gln Lys Gly Asn Ala Thr His Asp Asn
170      175      180

ATA TGT TCC CGA AAC AGT GAA TCA ACT CAA AAA TGT GGA ATA GAT GTT      690
Ile Cys Ser Gly Asn Ser Glu Ser Thr Gln Lys Cys Gly Ile Asp Val
185      190      195

ACC CTG TGT GAG GAG GCA TTC TTC AGG TTT GCT GTT CCT ACA AAG TTT      738
Thr Leu Cys Glu Glu Ala Phe Phe Arg Phe Ala Val Pro Thr Lys Phe
200      205      210      215

ACG CCT AAC TGG CTT ACT GTC TTG GTA GAC AAT TTG CTT GGC ACC AAA      786
Thr Pro Asn Trp Leu Ser Val Leu Val Asp Asn Leu Pro Gly Thr Lys
220      225      230

GTA AAC CCA GAG AGT GTA GAG ACG ATA AAA CGG CAA CAC AGC TCA CAA      834
Val Asn Ala Glu Ser Val Glu Arg Ile Lys Arg Gln His Ser Ser Gln
235      240      245

GAA CAG ACT TTC CAG CTG CTG AAG TTA TGG AAA CAT CAA AAC AAA GCC      882
Glu Gln Thr Phe Gln Leu Leu Lys Leu Trp Lys His Gln Asn Lys Ala
250      255      260

CAA GAT ATA GTC AAG AAG ATC ATC CAA GAT ATT GAC CTC TGT GAA AAC      930
Gln Asp Ile Val Lys Lys Ile Ile Gln Asp Ile Asp Leu Cys Glu Asn
265      270      275

AGC GTG CAG CGG CAC ATT GGA CAT GCT AAC CTC ACC TTC GAG CAG CTT      978
Ser Val Gln Arg His Ile Gly His Ala Asn Leu Thr Phe Glu Gln Leu
280      285      290      295

CGT ACC TTG ATG GAA AGC TTA CCG GGA AAG AAA GTG GGA GCA GAA GAC      1026
Arg Ser Leu Met Glu Ser Leu Pro Gly Lys Lys Val Gly Ala Glu Asp
300      305      310

```

```

ATT GAA AAA ACA ATA AAG GCA TGC AAA CCC AGT GAC CAG ACC CTG AAG      1074
Ile Glu Lys Thr Ile Lys Ala Cys Lys Pro Ser Asp Gln Ile Leu Lys
      115      320      325

CTG CTC AGT TTG TGG CGA ATA AAA AAT GGC GAC CAA GAC ACC TTG AAG      1122
Leu Leu Ser Leu Trp Arg Ile Lys Asn Gly Asp Gln Asp Thr Leu Lys
      330      335      340

GGC CTA ATG CAC GCA CTA AAG CAC TCA AAG ACG TAC CAC TTT CCC AAA      1170
Gly Leu Met His Ala Leu Lys His Ser Lys Thr Tyr His Phe Pro Lys
      345      350      355

ACT GTC ACT CAG AGT CTA AAG AAG ACC ATC AGG TTC CTT CAC AGC TTC      1218
Thr Val Thr Gln Ser Leu Lys Lys Thr Ile Arg Phe Leu His Ser Phe
      360      365      370      375

ACA ATG TAC AAA TTG TAT CAG AAG TTA TTT TTA GAA ATG ATA GGT AAC      1266
Thr Met Tyr Lys Leu Tyr Gln Lys Leu Phe Leu Glu Met Ile Gly Asn
      380      385      390

CAG GTC CAA TCA GTA AAA ATA AGC TGC TTA T AACTGGAAAT GGCCATTGAG      1317
Gln Val Gln Ser Val Lys Ile Ser Cys Leu
      395      400

CTGTTTCCTC ACAATTGGCG AGATCCCATG GATGATAA      1355

```

(2) INFORMATION FÜR SEQ ID NR: 2

- (i) SEQUENZCHARAKTERISTIKA:
 - (A) LÄNGE: 401 Aminosäuren
 - (B) TYP: Aminosäure
 - (D) TOPOLOGIE: linear
- (ii) MOLEKÜLTYP: Protein
- (xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NR: 2

```

Met Asn Lys Leu Leu Cys Cys Ala Leu Val Phe Leu Asp Ile Ser Ile
 1          5          10          15

Lys Trp Thr Thr Gln Glu Thr Phe Pro Pro Lys Tyr Leu His Tyr Asp
 20          25          30

Glu Glu Thr Ser His Gln Leu Leu Cys Asp Lys Cys Pro Pro Gly Thr
 35          40          45

Tyr Leu Lys Gln His Cys Thr Ala Lys Trp Lys Thr Val Cys Ala Pro
 50          55          60

Cys Pro Asp His Tyr Tyr Thr Asp Ser Trp His Thr Ser Asp Glu Cys
 65          70          75          80

Leu Tyr Cys Ser Pro Val Cys Lys Glu Leu Gln Tyr Val Lys Gln Glu
 85          90          95

Cys Asn Arg Thr His Asn Arg Val Cys Glu Cys Lys Glu Gly Arg Tyr
100          105          110

Leu Glu Ile Glu Phe Cys Leu Lys His Arg Ser Cys Pro Pro Gly Phe
115          120          125

Gly Val Val Gln Ala Gly Thr Pro Gln Arg Asn Thr Val Cys Lys Arg
130          135          140

Cys Pro Asp Gly Phe Phe Ser Asn Glu Thr Ser Ser Lys Ala Pro Cys
145          150          155          160

Arg Lys His Thr Asn Cys Ser Val Phe Gly Leu Leu Leu Thr Gln Lys
165          170          175

```

```

Gly Asn Ala Thr His Asp Asn Ile Cys Ser Gly Asn Ser Glu Ser Thr
    180              185              190
Gln Lys Cys Gly Ile Asp Val Thr Leu Cys Glu Glu Ala Phe Phe Arg
    195              200              205
Phe Ala Val Pro Thr Lys Phe Thr Pro Asn Trp Leu Ser Val Leu Val
    210              215              220
Asp Asn Leu Pro Gly Thr Lys Val Asn Ala Glu Ser Val Glu Arg Ile
    225              230              235              240
Lys Arg Gln His Ser Ser Gln Glu Gln Thr Phe Gln Leu Leu Lys Leu
    245              250              255
Trp Lys His Gln Asn Lys Ala Gln Asp Ile Val Lys Lys Ile Ile Gln
    260              265              270
Asp Ile Asp Leu Cys Glu Asn Ser Val Gln Arg His Ile Gly His Ala
    275              280              285
Asn Leu Thr Phe Glu Gln Leu Arg Ser Leu Met Glu Ser Leu Pro Gly
    290              295              300
Lys Lys Val Gly Ala Glu Asp Ile Glu Lys Thr Ile Lys Ala Cys Lys
    305              310              315              320
Pro Ser Asp Gln Ile Leu Lys Leu Leu Ser Leu Trp Arg Ile Lys Asn
    325              330              335
Gly Asp Gln Asp Thr Leu Lys Gly Leu Met His Ala Leu Lys His Ser
    340              345              350
Lys Thr Tyr His Phe Pro Lys Thr Val Thr Gln Ser Leu Lys Lys Thr
    355              360              365
Ile Arg Phe Leu His Ser Phe Thr Met Tyr Lys Leu Tyr Gln Lys Leu
    370              375              380
Phe Leu Glu Met Ile Gly Asn Gln Val Gln Ser Val Lys Ile Ser Cys
    385              390              395              400
Leu

```

Patentansprüche

1. Verwendung von Osteoprotegerin (OPG) zur Herstellung eines Medikaments zur Behandlung oder Vermeidung einer kardiovaskulären Krankheit.
2. Die Verwendung gemäß Anspruch 1, wobei die kardiovaskuläre Krankheit mit Atherosklerose oder Arteriosklerose Typ Mönckeberg verbunden ist.
3. Die Verwendung gemäß Anspruch 1, wobei das Medikament für die gleichzeitige Verabreichung mit einem anti-hypertonischen Heilmittel vorgesehen ist.
4. Die Verwendung gemäß Anspruch 1, wobei das Medikament für die gleichzeitige Verabreichung mit einem Cholesterin senkenden Heilmittel vorgesehen ist.
5. Die Verwendung gemäß Anspruch 1, wobei vorgesehen ist, dass das Medikament vor, gleichzeitig mit oder nach dem Auftreten einer kardiovaskulären Krankheit verabreicht wird.
6. Die Verwendung gemäß Anspruch 1, wobei das Medikament für eine Verabreichung in Verbindung mit einer chirurgischen oder angioplastischen Behandlung vorgesehen ist.
7. Die Verwendung gemäß Anspruch 1, wobei vorgesehen ist, dass das Medikament gleichzeitig mit einem anti-resorptiven Wirkstoff verabreicht wird, der aus der Gruppe ausgewählt ist, die aus Östrogenen, Vitamin-D-Verbindungen und selektiven Östrogen-Rezeptor-Modulatoren besteht.
8. Die Verwendung gemäß Anspruch 1, wobei Osteoprotegerin ein verkürztes OPG-Polypeptid ist.
9. Die Verwendung gemäß Anspruch 8, wobei für das verkürzte Polypeptid am Carboxyterminus von OPG bis zu 216 Aminosäuren entfernt wurden, wie in SEQ ID NR. 2 gezeigt.

10. Die Verwendung gemäß Anspruch 1, wobei Osteoprotegerin ein chimärisches Polypeptid umfaßt, das ein verkürztes OPG-Polypeptid umfaßt, das an eine Fc-Region humaner IgG fusioniert ist.

11. Die Verwendung gemäß Anspruch 10, wobei der Carboxyterminus der Fc-Region an den Aminotermi-
nus des verkürzten OPG-Polypeptids fusioniert ist.

12. Die Verwendung gemäß Anspruch 10, wobei der Aminotermi-
nus des verkürzten OPG-Polypeptids fusioniert ist.

13. Die Verwendung gemäß Anspruch 9, wobei das verkürzte OPG-Polypeptid ein kovalent-verknüpftes
Multimer ist.

14. Die Verwendung gemäß der Ansprüche 11 oder 12, wobei das verkürzte OPG-Polypeptid die Reste
22-185, 22-189, 22-194 oder 22-201, wie in SEQ ID NR. 2 gezeigt, umfaßt.

15. Die Verwendung gemäß Anspruch 1, wobei Osteoprotegerin die Reste 22-401 umfaßt, wie in SEQ ID
NR. 2 gezeigt.

16. Verwendung einer Nukleinsäure, die für Osteoprotegerin kodiert, zur Herstellung eines Medikaments
zur Behandlung oder Vermeidung einer kardiovaskulären Krankheit.

Es folgen 4 Blatt Zeichnungen

Anhängende Zeichnungen

FIG.1A



FIG.1B



FIG.1C

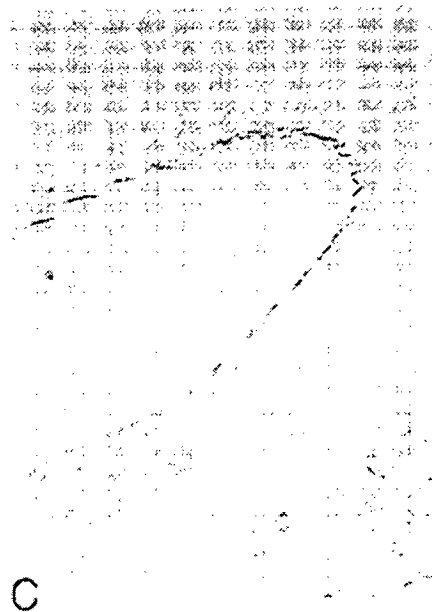


FIG.1D

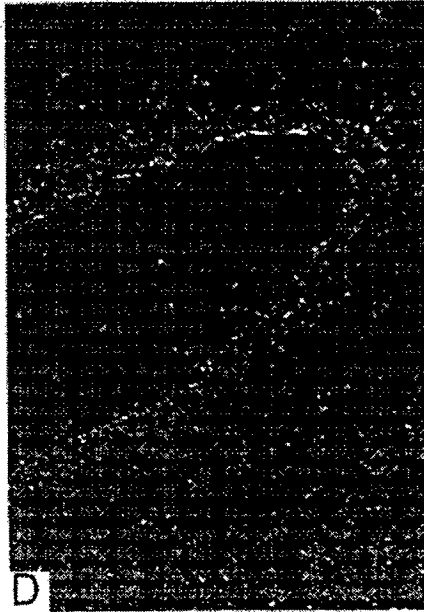


FIG.2A

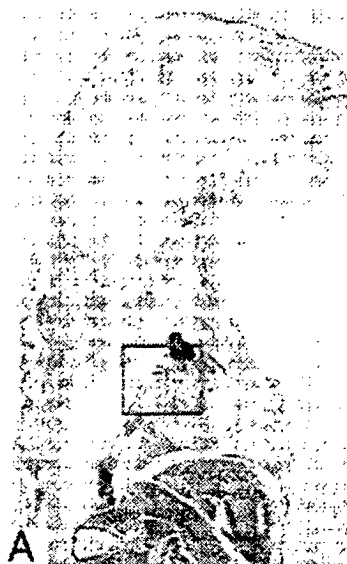


FIG.2B

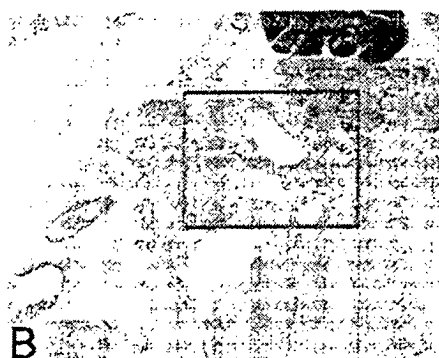


FIG.2C



FIG.2D

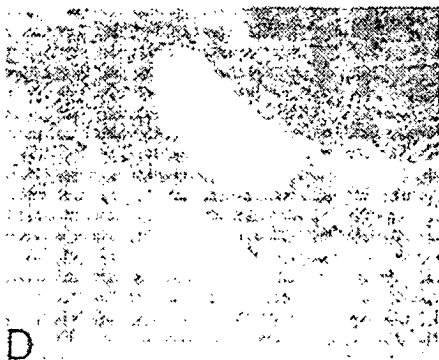


FIG.2E



FIG.3A



FIG.3B



FIG.3C



FIG.3D



FIG.4A



FIG.4B



FIG.4C



FIG.4D

