

CAVELIER

ABOGADOS

EDIFICIO SISKI

CARRERA 4ª N° 72-35

BOGOTÁ, 8 - COLOMBIA

For patents, utility models, industrial designs, trademarks, commercial names, trade emblems, slogans.

Para patentes, modelos de utilidad, diseños industriales, marcas de fábrica, nombres comerciales, enseñas, lemas comerciales.

REPRESENTACION Y PODER

REPRESENTATION AND POWER OF ATTORNEY

I (we), the undersigned / Yo (nosotros), abajo firmado (s)

SANKYO COMPANY, LIMITED

of/domiciliado (s) en 5-1, 3-chome,

Nihonbashi-honcho, Chuo-ku, Tokyo, Japan, hereby ratify the appln

Nos. 01084567; 01084568; 01084570; 01084571; 01084572; 01084574; filed by Emilio Ferrero on Oct. 3/0

por el presente nombramos a GERMAN CAVELIER, tpa. 832; GONZALO PERDOMO, tpa. 831; EMILIO FERRERO, tpa. 31929; y LUZ CLEMENCIA DE PAEZ, tpa. 23555; domiciliados en la Carrera 4ª N° 72-35, Bogotá, Colombia, en obediencia a lo dispuesto en el parágrafo 1º del Artículo 543 del Código de Comercio, el primero como principal y los demás como suplentes, en su orden, como mis (nuestros) representantes en todos los asuntos de propiedad industrial con facultad para recibir notificaciones y nombrar apoderados judiciales o extrajudiciales. El primer representante suplente reemplazará al principal en caso de ausencia o impedimento temporal o definitivo de aquél. La misma regla se aplicará cuando el segundo representante suplente haya de reemplazar al primero, o el tercero al segundo. En tales casos, el representante principal, o el primero, o segundo suplente, en su caso, o ambos, declararán su intención de no ejercer la representación mediante declaración autenticada por Notario Público en Colombia, o por Notario u otro Funcionario Público, o Cónsul de Colombia, en el extranjero; y si se tratare de impedimento, con el certificado respectivo. Si alguno de los nombrados faltare definitivamente, el siguiente tomará su lugar. Cuando cesare la ausencia o impedimento del representante principal, o de su primero o segundo suplentes, en su caso, podrán ejercer la representación, en su orden, uno u otros según el caso, asumiéndola por el solo hecho de ejercerla, cesando en ese momento el ejercicio de la representación por el primero, segundo o tercer suplente en su caso.

Además, confiero (conferimos) poder a los abogados arriba nombrados, para obtener la protección de mi (nuestra) propiedad industrial y contra la competencia desleal, a cuyo efecto autorizo (amos) a los dichos apoderados para que me (nos) representen ante cualesquiera entidades o personas, ejerzan o no jurisdicción, especialmente ante las del orden administrativo, contencioso-administrativo y judicial, así como los tribunales de arbitramento, en todo lo concerniente a los siguientes asuntos: a) Obtención de patentes de invención, modelos de utilidad, y diseños industriales; el registro de marcas de fábrica, colectivas, defensivas, de servicio, lemas comerciales, nombres comerciales, enseñas, variedades vegetales y denominaciones de origen; su renovación, traspaso, cambio de nombre o domicilio, cancelación voluntaria; y el registro de licencias de uso de esos derechos; b) Las acciones de competencia desleal, protección del consumidor, oposiciones u observaciones, cancelación administrativa y judicial, nulidad, medidas cautelares, concesión de licencias, la tutela, la protección de secretos industriales, y en general los juicios civiles, penales, administrativos o contencioso-administrativos relacionados con estos derechos; acciones y procesos que promovamos o se nos promuevan. Y para que en todos los asuntos arriba determinados, puedan sustituir este mandato, transigir, conciliar, admitir los hechos del proceso, desistir, cancelar, recibir, renunciar, y ratificar los actos de agentes oficiosos.

In due compliance with the terms of paragraph 1st. of article 543 of the Commercial Code, do hereby appoint GERMAN CAVELIER, tpa. 832; GONZALO PERDOMO, tpa. 831; EMILIO FERRERO, tpa. 31929; and LUZ CLEMENCIA DE PAEZ, tpa. 23555; domiciled at Carrera 4ª N° 72-35, Bogotá, Colombia, the first as principal and the others as alternates, in the order of their appointment, as our representatives for all industrial property matters with faculty to receive notifications and to appoint attorneys in and out of Court. The first alternate shall replace the principal in case of his absence or of temporal or definitive impediment. The same rule will apply when the second alternate representative is to replace the first one, or when the third is to replace the first or second alternates in their turn, or both of them, second. In such cases, the principal representative, or the first or second alternates in their turn, or both of them, shall state their intention not to act as representatives through a declaration given before a Notary Public in Colombia, or before a Notary or another Public Official or a Colombian Consul abroad; and in case of impediment, the appropriate certificate shall suffice. If any of the appointees were to be definitely absent, the following alternate shall take his place. When the absence or impediment of the principal representative, or of the first or second alternate in their turn ceases, the representation can be taken again in their sequence, by the principal, the first or second alternate depending on case, and the mere fact or its exercise will suffice. The exercise of the representation by the first, second or third alternates in their turn shall end at such time.

In addition, we grant a Power of Attorney in favor of the above-named attorneys-at-law so that they may obtain the protection of my (our) industrial property and against the unfair competition, for which purpose I (we) authorize the said attorneys to represent me (us) before any authorities or persons, with or without jurisdiction, specially those administrative, administrative contentious and judicial, as well as before Arbitration Court, in all matters concerning the following: a) Obtainment of patents, utility models and industrial designs; the registration of trademarks, collective, defensive and service marks, slogans, commercial names, trade emblems, vegetal varieties and denominations of origin; its renewal, assignment, change of name or domicile, voluntary cancellation; and the registration of licenses of use of the above rights; b) Actions of unfair competition, protection to the consumer, oppositions or observations, administrative or Court cancellation, nullity, infringement, granting of licenses, the action for writ mandamus, the protection of trade secrets, and in general the civil, penal, and administrative suits relating to those rights; actions and suits instituted by me (us) or against me (us). And that in all the above matters they may substitute this Power of Attorney, compromise, conciliate, admit the facts of the case, desist, cancel, receive, resign, and ratify acts done by representatives with

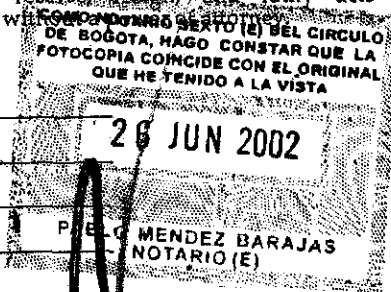
Given and signed this / Dado y firmado hoy

4th day of October, 2001

in/en Tokyo, Japan

X: *Tetsuo Takato*
Signature

Tetsuo Takato
Representative Director and President

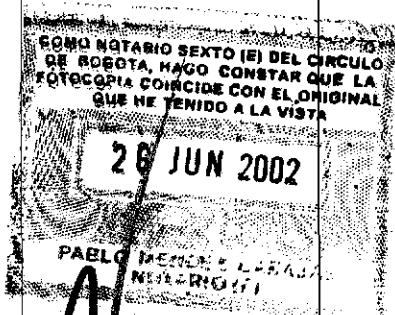


LEGALIZACION

El Señor Cónsul de Colombia debe expedir un certificado consular sobre (1) la existencia legal de la compañía que otorga el poder, (2) que ésta ejerce su objeto social, y (3) que las personas que otorgan el poder están autorizadas para darlo. A este efecto les solicitamos que muestren al Señor Cónsul las pruebas que acreditan esos hechos (1), (2) y (3).

LEGALIZATION

The Colombia Consul must issue a consular certificate, on (1) the legal existence of the company which grants the Power-of-Authority, (2) that it is in actual exercise of its company purposes, and (3) that the persons who execute the Power of Attorney is authorized to do so. To this effect, please show the Consul the evidence to prove the above facts (1), (2) and (3).



NOTA PARA EL SEÑOR CONSUL DE COLOMBIA: Según los artículos 65 del C. de P.C. y 480 del C. de Co., si el poderdante es una sociedad, el Señor Cónsul debe certificar que tuvo a la vista las pruebas de su existencia, que ejerce su objeto social y que quien confiere el poder es su representante.

94
Registration No. 1021 of 2001

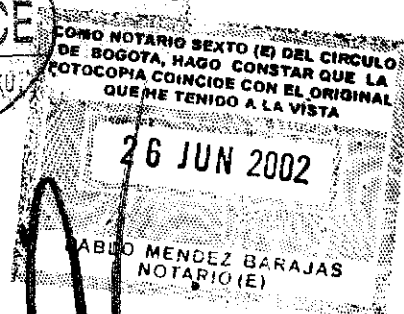
NOTARIAL CERTIFICATE

This is to certify that Tetsuo TAKATO who is Representative Director and President of SANKYO COMPANY, LIMITED, a corporation duly organized and existing under the Laws of Japan, located at 5-1, 3-chome, Nihonbashi-honcho, Chuo-ku, Tokyo, Japan and who is authorized to sign the attached document, has acknowledged himself that signature on the foregoing document is his own.

Dated on this 4th day of October, 2001.

Motoharu Furukawa

Notary: MOTOHARU FURUKAWA



1000

COMO NOTARIO SEXTO (E) DEL CIRCULO
DE BOGOTA, HAGO CONSTAR QUE LA
FOTOCOPIA COINCIDE CON EL ORIGINAL
QUE HE TENIDO A LA VISTA

28 JUN 2002

PABLO MENDEZ BARAJAS
NOTARIO (E)



平成 13 年 登 簿 第 1021 号



認 証

嘱 託 人 三共株式会社（本店 東京都中央区日本橋本町三丁目 5 番 1 号）
代表取締役 高藤鉄雄は、日本国法に基づいて設立された同会社を代表し
その権限に基づき添付証書に署名した旨、本公証人に対し自認した。

よつて、これを認証する。

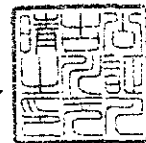
平成 13 年 10 月 4 日、本公証人役場において

東京都千代田区麹町 5 丁目 2 番地 1

東京法務局所属

公 証 人

古川元晴



証 明

上記署名は、東京法務局所属公証人の署名に相違ないものであ
り、かつ、その押印は、真実のものであることを証明する。

平成 13 年 10 月 4 日

東京法務局長

寶 金 敏 明

CERTIFICATE

This is to certify that the signature affixed above has been provided
by Notary, duly authorized by the Tokyo Legal Affairs Bureau and that
the Official Seal appearing on the same is genuine.

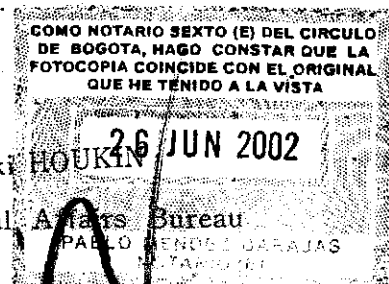
Date 4th October, 2001

Toshiaki

HOUKIN

26 JUN 2002

Director of the Tokyo Legal Affairs Bureau



APOSTILLE

(Convention de La Haye du 5 octobre 1961)

1. Country: JAPAN

This public document

2. has been signed by Toshiaki HOUKIN

3. acting in the capacity of Director of the Tokyo Legal Affairs Bureau

4. bears the seal/stamp of

Certified

5. at Tokyo

6. 4th October, 2001

7. by the Ministry of Foreign Affairs

8. 01 - Nº 021563

9. Seal/stamp:

10. Signature:

T. Mochizuki

Takeshi MOCHIZUKI

For the Minister for Foreign Affairs



72

TRADUCCIÓN OFICIAL No. 12.10/01 realizada por Diego Vargas,
Traductor Oficial, Resolución No. 0001 de 1999 del Ministerio de
Justicia y registrado ante el Ministerio de Relaciones Exteriores
de Colombia.

A continuación se traducen los sellos y legalizaciones de un
documento de escrito en inglés y español por medio del cual
SANKYO COMPANY, LIMITED domiciliado en el 5-1, 3-chome,
Nihonbashi-honcho, Chuo-ku, Tokio, Japón por el presente ratifica
las solicitudes de registro de marca Nos. 01084567; 10184568;
01084570; 01084571; 01084572; 01084574; presentadas por el Dr.
Emilio Ferrero el 03 de octubre de 2001.

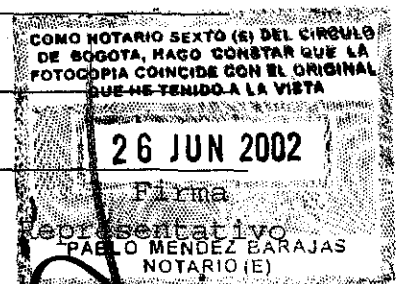
Y adicionalmente otorga derechos de Representación y Poder a los
Doctores GERMÁN CAVELIER, tpa. 832; GONZALO PERDOMO, tpa. 831;
EMILIO FERRERO, tpa. 31929; y LUZ CLEMENCIA DE PÁEZ, tpa. 23555.

Dado y firmado hoy _____

4 de octubre de 2001

En Tokio, Japón

Director Financiero
Firma Tetsuo Takato
Director y Presidente Representativo



(Anexo)

Registro No. 1021 de 2001

CERTIFICADO NOTARIAL

El presente es para certificar que Tetsuo TAKATO, quien
es Director y Presidente Representativo de SANKYO COMPANY,
LIMITED, una corporación debidamente constituida y existente de

88

acuerdo a las Leyes de Japón, ubicada en el 5-1, 3-chome,
Nihonbashi-honcho, Chuo-ku, Tokio, Japón y quien está autorizado
a firmar el adjunto documento, ha reconocido él mismo que la
firma en el anterior documento es la suya.

Fechado hoy 4 de octubre de 2001.

Firma ilegible

Notario: MOTOHARU FURUKAWA

Oficina de Asuntos Legales de Tokio
OFICINA NOTARIAL
5-2-1, Kojimachi, Chiyoda-ku,
Tokio, Japón

Sellos rojos cuadrados en la parte superior así como al lado de
la firma anterior.

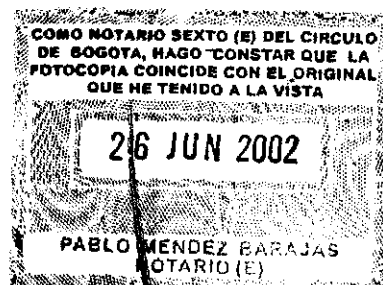
LA CÁMARA DE COMERCIO E INDUSTRIA DE TOKIO

3-2-2 MARUNOUCHI, CHIYODA-KU, TOKIO 100-0005, JAPÓN TEL:81-3-3283-7610 FAX:81-3-3201-6265

Octubre 4 de 2001

A quien pueda interesar:

Certificado



Por el presente certificamos que la compañía mencionada a
continuación fue constituida de acuerdo a la Ley Comercial
Japonesa.

Nombre de la compañía: SANKYO COMPANY, LIMITED

9
9

Domicilio: 5-1, Nihonbashi-honcho 3-chome, Chuo-ku, Tokio

Fecha de Constitución: 1 de Marzo de 1913

La Cámara de Comercio e Industria de Tokio

Firma Ilegible

Hiroyuki Amaya

Subdirector

Sello: LA CÁMARA DE COMERCIO DE TOKIO

B064302

Aparece un anexo en japonés con el número 1021 en la parte superior y con varios sellos cuadrados en tinta roja en todo el documento. En la parte inferior aparece texto en inglés:

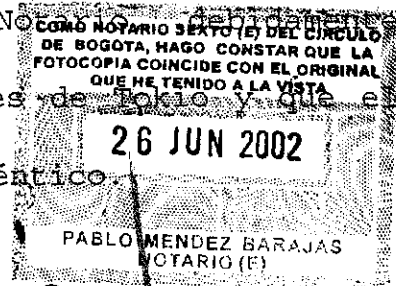
CERTIFICADO

El presente es para certificar que la firma colocada anteriormente ha sido otorgada por un Notario Público autorizado por la Oficina de Asuntos Legales de Tokio y que el Sello Oficial que aparece en el mismo es auténtico.

Fecha: 4 de octubre de 2001

Toshiaki HOUKIN

Director de la Oficina de Asuntos Legales



APOSTILLA

(Convention de La Haye du 5 octobre 1961)

1. País: JAPÓN

- Este documento público
2. ha sido firmado por Toshiaki HOUKIN
 3. actuando en capacidad de Director de la Oficina de Asuntos Legales de Tokio
 4. lleva el sello/estampilla de

CERTIFICADO

5. en Tokio
6. El 4 de octubre de 2001
7. por el Ministerio de Relaciones Exteriores
8. 01- No. 021563
9. Sello/estampilla
10. Firma:



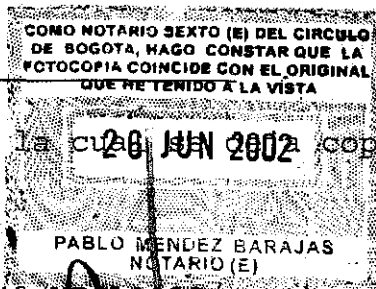
Firma

Takeshi MOCHIZUKI

Por el Ministerio de Relaciones Exteriores

Es traducción fiel y completa de la cual se copia en esta oficina para su confrontación.

/COLO 01579-701-005-3 /DVZ/ID-2743/WPCL002G/



Diego F. Vargas
DIEGO F. VARGAS Z.
TRADUCTOR E INTERPRETE OFICIAL
ESPAÑOL - INGLES - INGLES - ESPAÑOL
RES. 0001 DE ENERO 4 DE 1999
MINISTERIO DE JUSTICIA

MINISTERIO DE RELACIONES
EXTERIORES

179830

COMO NOTARIO SEXTO (E) DEL CIRCULO
DE BOGOTA, HAGO CONSTAR QUE LA
FOTOCOPIA COINCIDE CON EL ORIGINAL
QUE HE TENIDO A LA VISTA

6 JUN 2002

PABLO MENDEZ
BARAJAS
NOTARIO (E)

NO SE ASUME
RESPONSABILIDAD DEL TEXTO

2001 OCT 12 P 12:13

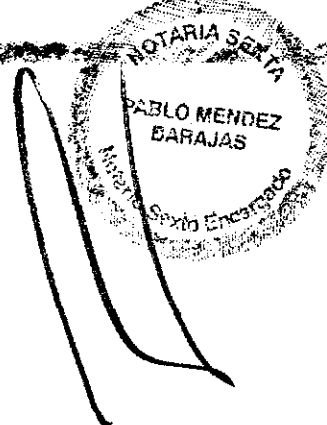
JEFE DE LEGALIZACIONES
SANTAFE DE BOGOTA D.C.

COMO NOTARIO SEXTO DEL CIRCULO DE SANTAFE DE
BOGOTA, HAGO CONSTAR QUE LA(S) ANTERIOR(ES) FIR-
MA(S) PUESTA(S) POR

IDENTIFICADOS CON C.C. No.(a)

ES(SON) AUTENTICA(S)

SANTAFE DE BOGOTA, 12 OCT. 2001



11
H

CAVELIER
ABOGADOS

WEB SITE: www.cavelier-abogados.com
E-MAIL: cavelier@colomsat.net.co

EDIFICIO SISKI
CARRERA 4 No. 72 - 35
BOGOTÁ 8, COLOMBIA

TELEFONO: (57) (1) 347-3611
TELEFAX: (57) (1) 217-9211 (57) (1) 310-4995

Señora Jefe de la
DIVISION DE NUEVAS CREACIONES
Superintendencia de Industria y Comercio
E. S. D.

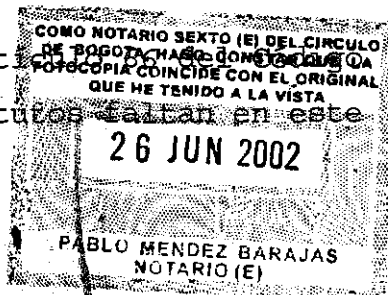
Poderdante: SANKYO COMPANY, LIMITED

Poder conferido el: 04-10-2001

Yo, GERMÁN CAVELIER, obrando en mi calidad de apoderado principal del poderdante arriba mencionado, atentamente manifiesto a Usted que sustituyo el poder que me ha sido conferido en la persona del doctor EMILIO FERRERO, Abogado con Tarjeta Profesional No. 31.929, con todas las facultades que me fueron conferidas.

Hago la anterior sustitución conforme al artículo 1.040 del Código de Procedimiento Civil ya que los otros sustitutos faltan en este momento.

Señora Jefe,




GERMÁN CAVELIER

T.P.A. No. 8.222

C.C. No. 2.877.924 de Bogotá

Acepto:


EMILIO FERRERO

T.P.A. N° 31.929

C.C. No. 438.019 de Usaquén

2e-780-2

NOTARIA SEXTA DE BOGOTA
RECONOCIMIENTO Y PRESENTACION PERSONAL

Bogota, D.C. 25 JUN 2002

NOTARIO JUAN MANUEL ESPINO MEDINA
NOTARIO SEXTO DEL CIRCULO DE BOGOTA

COMO NOTARIO SEXTO (E) DEL CIRCULO
DE BOGOTA, HAGO CONSTAR QUE LA
FOTOCOPIA COINCIDE CON EL ORIGINAL
QUE HE TENIDO A LA VISTA

Comprocedieron:

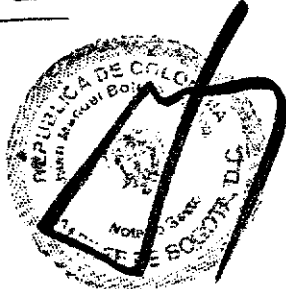
[Handwritten signatures]

26 JUN 2002

PABLO MENDEZ BARAJAS
NOTARIO (E)

quiles (ee) en libe (ee) en) to (ee) C.
2877924-428919
882-832-31829
y (ee) (ee) que lo (ee) (ee) que (ee) (ee)
en el presente documento (ee) (ee) (ee) (ee) (ee) (ee)
que el contenido del mismo es cierto. En constan-
cia se firma toda diligencia.

[Handwritten signatures]



COMPLEJO QUE COMPRENDE FACTOR INHIBIDOR DE
OSTEOCLASTOGENESIS Y POLISACARIDO

CAMPO TECNICO DE LA INVENCION

5

La presente invención se refiere a un complejo que comprende por lo menos un factor inhibidor de osteoclastogénesis (referido en lo sucesivo como OCIF), o un análogo del mismo o una variante del mismo, y por lo menos un polisacárido o un derivado del mismo, a un método para producir
10 dicho complejo, a un medicamento para tratar o prevenir enfermedades metabólicas óseas que comprenden el complejo como ingrediente activo, y al uso de dicho complejo para tratar o prevenir enfermedades metabólicas óseas.

15

ANTECEDENTES DE LA INVENCION

Los huesos contienen aproximadamente 99% del calcio total presente en el cuerpo vivo, y desempeñan por lo tanto una función importante no sólo en el soporte del cuerpo, sino funcionando también como el órgano de
20 almacenamiento más grande de calcio en el cuerpo. Los huesos desempeñan una función importante en el mantenimiento de la homeostasis del calcio. Se sabe que la activación de osteoclastos, la cual desempeña una función importante en la resorción ósea, causa flujo excesivo de calcio en la sangre desde los huesos para interrumpir la homeostasis de calcio en la sangre,
25 induciendo de esta manera hipercalcemia. Esta inducción de hipercalcemia por la activación de osteoclastos y promoción de resorción ósea, puede ser causada por citocinas que se secretan anormalmente como resultado de la diseminación de cáncer hacia el hueso [véase, por ejemplo, Jean-Jacques

Body, Current and Future Directions in Medical Therapy: Hypercalcemia, CANCER Supplement, 88(12), 3054-3058 (2000)]. El pronóstico para pacientes que sufren de hipercalcemia cancerosa es por lo general pobre, y es por lo tanto altamente deseable encontrar un tratamiento efectivo para esta

5 condición.

En reumatismo tal como artritis reumatoide y similares u osteoartritis, se sabe que la formación anormal o activación anormal de los osteoclastos es una de las causas principales de varios de los síntomas que se presentan en los huesos y articulaciones de pacientes que sufren de estas

10 condiciones [véase, por ejemplo, E. Romas, M. T. Gillespie y T. J. Martin, Involvement of Receptor Activator of NF- κ B Ligand and Tumor Necrosis Factor- α in Bone Destruction in Rheumatoid Arthritis, Bone, 30(2), 340-346 (2002)]. El dolor en las articulaciones y huesos debido a reumatismo tal como artritis reumatoide y osteoartritis, es extremadamente intenso, y es seriamente

15 perjudicial para la calidad de vida de los pacientes que sufren de estas funciones. De nuevo, es por lo tanto altamente deseable encontrar un tratamiento efectivo para estas condiciones.

Los osteoclastos son también conocidos por desempeñar una función en la osteoporosis. El balance de la resorción ósea promovida por los

20 osteoclastos y la formación de hueso promovida por los osteoblastos, se inclina gradualmente hacia la resorción ósea debida a la secreción reducida de hormonas femeninas después de la menopausia o debida al envejecimiento, como resultado de lo cual la densidad ósea disminuye y se produce osteoporosis si esta reducción en la densidad ósea es

25 suficientemente severa. Cuando pacientes de edad avanzada con un alto riesgo de osteoporosis sufren una fractura, la posibilidad de que queden postrados en cama es alta, y éste se ha vuelto un problema social como resultado de la población de edad cada vez más avanzada en todas partes del

mundo [véase, por ejemplo, Bruno Fautrel y Francis Guillemín, Cost of illness studies in rheumatic diseases, *Current Opinion in Rheumatology*, 14, 121-126 (2002)]. Por lo tanto, se ha buscado agudamente un medio efectivo para tratar o prevenir la osteoporosis.

5 Los tratamientos convencionales para estas condiciones incluyen la complementación de hormonas tales como estrógeno, y el uso de agentes que suprimen la actividad de los osteoclastos, tales como los bisfosfonatos o las calcitoninas [véase, por ejemplo, Mohammad M. Iqbal y Tanveer Sobhan, Osteoporosis: A Review, *Missouri Medicine*, 99(1), 19-23 (2002)]. Sin
10 embargo, las hormonas pueden tener efectos secundarios no deseables tales como el riesgo elevado de oncogénesis, la inducción de endometriosis y la hemorragia anormal de genitales [véase, por ejemplo, Joyce Penrose White y Judith S. Schilling, Postmenopausal Hormone Replacement: Historical Perspectives and Current Concerns, *Clinical Excellence for Nurse*
15 Practitioners, 4(5), 277-285 (2000)]. Aunque se sabe que los bisfosfonatos se unen fácilmente al exceso de calcio en la sangre y se acumulan en el hueso, algunos investigadores dudan que el grado de resistencia del hueso se pueda mejorar de esta manera. Además, se ha reportado también que existe riesgo de función renal deteriorada asociada con su uso [véase, por ejemplo,
20 Jonathan R. Green, Yves Seltenmeyer, Knut A. Jaeggi y Leo Wildler, Renal Tolerability Profile of Novel, Potent Bisphosphonates in Two Short-Term Rat Model, *Pharmacology and Toxicology*, 80, 225-230 (1997)]. Como para la calcitonina, el incremento en la densidad ósea obtenido con su uso es, desafortunadamente, transitorio. Se ha reportado también que la interrupción
25 de la administración de calcitonina puede causar regresión de la condición que está siendo tratada, mientras que la eficacia de las calcitoninas que se originan de animales diferentes de humanos, se puede reducir después de tratamiento prolongado como resultado de la aparición de anticuerpos

circulantes para la calcitonina en el cuerpo humano [S. L. Porcel, J. A. Cumplido, B. dela Hoz, M Cuevas y E. Losada, Anaphylaxis to calcitonin, Allergologia et Immunopathologia, 28(4), 243-245 (2000)].

Como se explicó anteriormente, los osteoclastos desempeñan una función importante en la promoción de la resorción ósea que es un factor importante que determina el incremento de la concentración de calcio en la sangre. Sin embargo, se piensa que ninguno de los medicamentos existentes mencionados anteriormente tiene actividad para suprimir la formación de osteoclastos. Por consiguiente, ninguno de estos medicamentos convencionales es adecuado para el tratamiento fundamental de las enfermedades metabólicas óseas, ya que sólo son capaces de manejar los síntomas, más que dirigir las causas.

Más recientemente, se ha demostrado que el OCIF es una proteína endógena que inhibe la diferenciación de una célula precursora de osteoclastos a un osteoclasto y/o la actividad de resorción ósea del osteoclasto maduro (véase los documentos WO-A-96/26217 y EP-A-0816380). El OCIF es conocido también como osteoprotegerina (véase el documento WO-A-97/23614). En vista del hecho de que las enfermedades metabólicas óseas mencionadas anteriormente tales como hipercalcemia, osteoporosis y artritis reumatoide resultan por lo menos hasta cierto grado de la resorción ósea, se abrigó la esperanza de que estas enfermedades se pudieran tratar con éxito usando el OCIF debido a su capacidad para suprimir la formación del osteoclasto mismo, y/o para suprimir la actividad de resorción ósea del osteoclasto maduro. Sin embargo, el OCIF es una proteína básica que tiene un punto isoeléctrico de alrededor de 9, y desaparece muy rápidamente de la corriente sanguínea después de su administración. Un intento para dirigir este problema, se describe en los documentos WO-A-2000/24416 y EP-A-1127578, en donde se prolongó hasta cierto grado el

tiempo en que el OCIF permanece en la sangre después de su administración (y por lo tanto el efecto del OCIF), coadministrando el OCIF con un polisacárido tal como heparina o sulfato de dextrán. Sin embargo, la prolongación del tiempo de retención logrado como resultado, puede no ser suficiente para dar la clase de retención prolongada del OCIF en la sangre que lo haría un candidato genuino para su uso en el tratamiento de enfermedades metabólicas óseas tales como hipercalcemia, osteoporosis y reumatismo. Por lo tanto, existe la necesidad de medios mejorados para prolongar el tiempo en que el OCIF es retenido en la corriente sanguínea después de su administración.

BREVE DESCRIPCION DE LA INVENCION

Es por lo tanto un objetivo de la presente invención, proveer una preparación que comprenda OCIF que permita prolongar el tiempo en que el OCIF es retenido en la corriente sanguínea después de su administración, proveyendo de esta manera un agente en el cual se mejore y prolongue el efecto del OCIF en el tratamiento y profilaxis de enfermedades metabólicas óseas que son mediadas por osteoclastos, tales como hipercalcemia, osteoporosis y reumatismo.

Otros objetivos y ventajas de la presente invención, serán evidentes conforme avance la descripción.

De esta manera, la presente invención provee un complejo que comprende por lo menos una sustancia seleccionada del grupo que consiste de OCIF, análogos del mismo y variantes del mismo, el cual se une a por lo menos una sustancia seleccionada del grupo que consiste de polisacáridos y derivados de los mismos.

La presente invención provee también un método para prolongar

17
19

el tiempo en que el OCIF o un análogo o variante del mismo, es retenido en la corriente sanguínea después de su administración a un paciente, combinando por lo menos uno de dicho OCIF, dicho análogo del mismo o dicha variante del mismo, con por lo menos un polisacárido o una variante del mismo.

5 La presente invención provee también una composición farmacéutica que comprende una cantidad efectiva de un agente farmacológicamente activo junto con un vehículo o diluyente para el mismo, en donde dicho agente farmacológicamente activo es un complejo que comprende por lo menos una sustancia seleccionada del grupo que consiste
10 de OCIF, análogos del mismo y variantes del mismo, el cual se une a por lo menos una sustancia seleccionada del grupo que consiste de polisacáridos y derivados de los mismos. En particular, provee dicha composición farmacéutica para el tratamiento o profilaxis de enfermedades metabólicas óseas.

15 La presente invención provee también un método para el tratamiento o profilaxis de enfermedades metabólicas óseas en un paciente, el cual comprende administrar a dicho paciente, una cantidad efectiva de un complejo que comprende por lo menos una sustancia seleccionada del grupo que consiste de OCIF, análogos del mismo y variantes del mismo, el cual se
20 une a por lo menos una sustancia seleccionada del grupo que consiste de polisacáridos, y derivados de los mismos.

 La presente invención provee también el uso de un complejo que comprende por lo menos una sustancia seleccionada del grupo que consiste de OCIF, análogos del mismo y variantes del mismo, el cual se une a por lo
25 menos una sustancia seleccionada del grupo que consiste de polisacáridos y derivados de los mismos, en la fabricación de un medicamento para la profilaxis o el tratamiento de enfermedades metabólicas óseas.

DESCRIPCION DETALLADA DE LA INVENCION

Se ha encontrado que incubando por lo menos una sustancia seleccionada de OCIF, análogos y variantes del mismo, con por lo menos una sustancia seleccionada de polisacáridos y derivados de los mismos, bajo condiciones que den como resultado la formación de un complejo en el cual dichas una o más sustancias seleccionadas de OCIF, análogos y variantes del mismo, se unen a dicha sustancia (por lo menos una) seleccionada de polisacáridos y derivados de los mismos, se produce de esta manera un agente en el cual se mejora y se prolonga el efecto de dicho OCIF o análogo o variante del mismo, en el tratamiento y profilaxis de enfermedades metabólicas óseas que son mediadas por osteoclastos, tales como hipercalcemia, osteoporosis y reumatismo. Esto se debe al hecho de que se prolonga el tiempo en que dicho OCIF o análogo o variante del mismo es retenido en la corriente sanguínea después de su administración, en comparación con las combinaciones de OCIF y polisacáridos de la técnica anterior descritas en los documentos WO-A-2000/24416 y EP-A-1127578.

Como se mencionó anteriormente, los complejos de la presente invención comprenden por lo menos una sustancia seleccionada de OCIF, análogos y variantes del mismo, que se unen a por lo menos una sustancia seleccionada de polisacáridos y derivados de los mismos. En dicho complejo, el OCIF y el polisacárido se unen entre sí mediante un enlace químico tal como un enlace covalente (por ejemplo, formación de base de Schiff), un enlace iónico o un enlace coordinado, o mediante un enlace no químico tal como una interacción hidrofóbica, un enlace de hidrógeno, una interacción electrostática o unión por afinidad.

El OCIF, un análogo del mismo o una variante del mismo que se usa en la presente invención, puede ser de tipo natural o puede ser de tipo

recombinante, y su origen no es particularmente limitado. El OCIF de tipo natural significa OCIF que se obtiene como una proteína producida en forma natural mediante extracción, purificación y/o aislamiento de un órgano, un fluido corporal, un cultivo de células o un medio de cultivo derivado de un humano o animal no humano. El OCIF de tipo recombinante, un análogo del mismo o una variante del mismo, es una proteína recombinante obtenida mediante extracción, purificación y/o aislamiento de dicha proteína de un hospedero usado convencionalmente en dichas técnicas, tal como una célula hospedera procariótica (por ejemplo, *Escherichia coli*) o una célula eucariótica tal como una línea de células humanas o no humanas que ha sido transformada con un vector que comprende un polinucleótido que codifica para un OCIF, un análogo del mismo o una variante del mismo [véase, por ejemplo, los métodos recombinantes descritos en los documentos EP-A-0816380 (WO-A-96/26217) y WO-A-97/23614].

El origen del OCIF, análogos del mismo y variantes del mismo que se usan en la presente invención, no es particularmente limitado, y se pueden derivar de un humano o un animal no humano. De preferencia, se pueden derivar de un mamífero tal como un humano, rata, ratón, conejo, perro, gato, vaca, cerdo, oveja o cabra; o un ave tal como un ave de corral, ganso, pollo o pavo. Más preferiblemente, se derivan de mamíferos, y muy preferiblemente, se derivan de humano.

El OCIF o análogo del mismo que se usa en la presente invención, puede ser un OCIF de tipo monómero (por ejemplo, en humanos, un monómero que tiene un peso molecular, medido mediante SDS-PAGE bajo condiciones no reductoras, de aproximadamente 60000) o de tipo dímero (por ejemplo, en humanos, un dímero que tiene un peso molecular de aproximadamente 120000, medido mediante SDS-PAGE bajo condiciones no reductoras) [véase el documento EP-A-0816380 (WO-A-96/26217)].

Se sabe que el OCIF es traducido en las células como un polipéptido que contiene un péptido de señal en el amino-terminal del mismo, y que es madurado entonces mediante procesamiento que implica la remoción de dicho péptido de señal [véase, por ejemplo, los métodos recombinantes descritos en los documentos EP-A-0816380 (WO-A-96/26217) y WO-A-97/23614]. El OCIF, análogo del mismo o variante del mismo que se usa en la presente invención, incluye el polipéptido que contiene un péptido de señal y la forma madurada del mismo. Ejemplos preferidos incluyen el OCIF en donde el péptido de señal tiene los aminoácidos -21 a +380 de SEQ. ID. NO. 1 del listado de secuencias, y el OCIF maduro sin el péptido de señal que tiene los aminoácidos +1 a +380 de SEQ. ID. NO. 1 del listado de secuencias. De estos, se prefiere en particular el OCIF maduro.

Se sabe también que se puede añadir metionina a dicha forma madurada del OCIF, un análogo del mismo o una variante del mismo, cuando se expresa como una proteína recombinante en una célula hospedera, especialmente en una célula hospedera procariótica tal como *Escherichia coli*. Esto se logra añadiendo un triplete de nucleótidos que tenga la secuencia ATG (AUG) al extremo 5' de un polinucleótido que codifica para una forma madurada del OCIF, un análogo del mismo o una variante del mismo, e insertando el polinucleótido resultante en un vector de expresión adecuado. La proteína madurada deseada que tenga metionina en el amino-terminal de la misma, puede ser expresada entonces por una célula hospedera adecuada que haya sido transformada por dicho vector de expresión recombinante. Además, uno o más aminoácidos se pueden añadir a dicha proteína en una posición próxima a la metionina del amino-terminal, mediante la adición de más tripletes de nucleótidos cerca del triplete de ATG añadidos en el extremo 5' del polinucleótido que codifica para una forma madurada del OCIF, un análogo del mismo o una variante del mismo.

En la presente invención, un análogo de OCIF significa una proteína codificada por un polinucleótido que existe naturalmente en las células, fluido corporal y/u órganos de un humano o un animal no humano tales como los ejemplificados anteriormente. Ejemplos preferidos específicos de dichos análogos incluyen OCIF2, OCIF3, OCIF4 y OCIF5 [véase el documento EP-A-0816380 (WO96/26217)]. Dichos análogos de OCIF o fragmentos activos del mismo, se pueden obtener mediante un método tal como el siguiente: se extrae ARN de una célula, órgano, tejido o fluido corporal de un humano o animal no humano; se sintetiza una primera cadena de ADNc que sea complementaria a dicho ARN usando una transcriptasa inversa, y entonces se sintetiza una segunda cadena de dicho ADNc usando la primera como molde usando una ADN polimerasa; el ADNc de doble cadena obtenido de esta manera, es insertado en un vector de expresión adecuado usado convencionalmente; una célula hospedera adecuada usada convencionalmente es transformada entonces por el vector obtenido de esta manera; el hospedero que produce el péptido deseado se selecciona entonces usando una técnica de hibridación tal como hibridación en placa o hibridación por fagos usando ADNc de OCIF o un fragmento del mismo como sonda, bajo condiciones severas [véase el documento EP-A-0816380 (WO-A-96/26217)]; y entonces finalmente el análogo de OCIF deseado es expresado mediante una técnica convencional por la célula hospedera obtenida de esta manera.

En la presente invención, una variante de OCIF significa una proteína que tiene una secuencia de aminoácidos en donde uno o más residuos de aminoácido han sido sustituidos en, deletados (eliminados) de, añadidos a, o insertados en, la secuencia de aminoácidos de un OCIF o un análogo del mismo, y tiene aún por lo menos cierta actividad de OCIF. Dichas variantes de OCIF se pueden obtener, por ejemplo, mediante el siguiente

método: sustituyendo, deletando (eliminando), añadiendo y/o insertando uno o más nucleótidos en una secuencia de nucleótidos que codifique para OCIF o un análogo del mismo, usando un método de reacción en cadena de polimerasa (referido en lo sucesivo como PCR), un método de recombinación genética o un método de digestión por nucleasa usando una exonucleasa o endonucleasa tal como una enzima de restricción; transformando una célula hospedera eucariótica tal como una célula animal o una célula hospedera procariótica tal como *Escherichia coli* con un vector de expresión, en donde el nucleótido obtenido que codifica para la variante de OCIF deseada ha sido insertado; y entonces extrayendo, purificando y/o aislando el péptido deseado a partir de la fracción que contiene proteína producida por un cultivo de células de dicho hospedero transformado de acuerdo con un método bien conocido por los expertos en la técnica.

Formas truncadas de OCIF, en donde una parte considerable de la secuencia de aminoácidos ha sido eliminada del carboxi-terminal de un polipéptido OCIF, son también conocidas por mantener por lo menos cierta actividad de OCIF [véase, por ejemplo, los documentos EP-A-0816380 (WO-A-96/26217) y WO-A-97/23614]. Dichos tipos truncados de OCIF que retienen por lo menos cierta actividad del polipéptido OCIF completo, se incluyen también en las variantes de OCIF de la presente invención.

Se conoce además el OCIF o una forma truncada del mismo que está fusionado con un dominio de inmunoglobulina tal como el dominio Fc (por ejemplo, un polipéptido de fusión en el cual el dominio Fc de IgG humana está unido al carboxi-terminal del OCIF), y el cual retiene por lo menos parte de la actividad del polipéptido OCIF completo (véase el documento WO-A-97/23614), y dichas proteínas de fusión se incluyen también en las variantes de OCIF de la presente invención.

Se ha mostrado también que el OCIF o un análogo del mismo o

una variante del mismo puede ser modificado químicamente, y retiene aún actividad útil y, en algunos casos, puede mostrar ventajas tales como estabilidad incrementada o inmunogenicidad disminuida. Dicha modificación química puede incluir derivación en sólo un sitio en la molécula del OCIF o un
5 análogo del mismo o una variante del mismo, o en más de un sitio. Por ejemplo, se ha mostrado que el OCIF y variantes (derivados) del mismo, tal como una forma truncada, pueden ser modificados químicamente con uno o más polímeros solubles en agua tales como polietilenglicol, copolímeros de etilenglicol/propilenglicol, carboximetilcelulosa y alcohol polivinílico y pueden
10 mostrar, como resultado, actividad biológica mejorada (véase, por ejemplo, el documento WO-A-97/23614). Dichos tipos de OCIF químicamente modificados, o un análogo de los mismos o una variante de los mismos, se incluyen también en las variantes de OCIF de la presente invención.

Ejemplos de variantes de OCIF conocidas que son adecuadas
15 para su uso en la preparación de los complejos de la presente invención, incluyen: OCIF-C19S, OCIF-C20S, OCIF-C21S, OCIF-C22S, OCIF-C23S, OCIF-DCR1, OCIF-DCR2, OCIF-DCR3, OCIF-DCR4, OCIF-DDD1, OCIF-DDD2, OCIF-CL, OCIF-CC, OCIF-CDD2, OCIF-CDD1, OCIF-CCR4, OCIF-CCR3, OCIF-CBst, OCIF-CSph, OCIF-CBsp, OCIF-CPst [véase el documento
20 EP-A-0816380 (WO-A-96/26217)], muOPG[22-401]-Fc, muOPG[22-194]-Fc, muOPG[22-185]-Fc, muOPG[22-180]-Fc, muOPG[22-401], muOPG[22-401]C195, muOPG[22-401]C202, muOPG[22-401]C277, muOPG[22-401]C319, muOPG[22-401]C400, muOPG[22-185], muOPG[22-194], muOPG[22-200], muOPG[22-212], muOPG[22-293], muOPG[22-355],
25 huOPG[22-401]-Fc, huOPG[22-201]-Fc, huOPG[22-401]-Fc P26A, huOPG[22-401]-Fc Y28F, huOPG[22-401], huOPG[27-401]-Fc, huOPG[29-401]-Fc, huOPG[32-401]-Fc, muOPG met[22-194], muOPG met[22-194] 5k PEG, muOPG met[22-194] 20k PEG, huOPG met[22-194]P25A, huOPG met[22-

24
24

194]P25A 5k PEG, huOPG met[22-194]P25A 20k PEG, huOPG met[22-194]P25A 31k PEG, huOPG met[22-194]P25A 57k PEG, huOPG met[22-194]P25A 12 k PEG, huOPG met[22-194]P25A 20k PEG ramificado, huOPG met[22-194]P25A 8k PEG dímero, huOPG met[22-194]P25A entrelazamiento con disulfuro (véase el documento WO-A-97/23614), OPG[22-194]-Fc, OPG[22-201]-Fc, OPG[22-194]-Fc Δ C, OPG[22-201]-Fc Δ C, OPG[22-194]-FcG₁₀, metFc Δ C-OPG[22-194] (véase el documento WO-A-2001/17543), OPG[22-194]-Fc Δ C, OPG[22-194]-FcG₁₀, Fc Δ C-OPG[22-194], metFc Δ C-OPG[22-194], metFc Δ C-22-194, OPG[22-194]-Fc, OPG[22-194]-Fc Δ C, metOPG[22-194], metOPG[22-201], OPG[22-293], OPG[22-401] y metFc Δ C-22-194 (véase el documento WO-A-2001/18203).

De estas, ejemplos preferidos incluyen: OCIF-C19S, OCIF-C20S, OCIF-C21S, OCIF-C22S, OCIF-C23S, OCIF-DCR1, OCIF-DCR2, OCIF-DCR3, OCIF-DCR4, OCIF-DDD1, OCIF-DDD2, OCIF-CL, OCIF-CC, OCIF-CDD2, OCIF-CDD1, OCIF-CCR4, OCIF-CCR3, OCIF-CBst, OCIF-CSph, OCIF-CBsp, OCIF-CPst, muOPG[22-401]-Fc, muOPG[22-194]-Fc, muOPG[22-185]-Fc, muOPG[22-401]C195, muOPG[22-401]C202, muOPG[22-401]C319, muOPG[22-401]C400, muOPG[22-194], muOPG[22-200], muOPG[22-293], muOPG[22-355], huOPG[22-401]-Fc, huOPG[22-201]-Fc, huOPG[22-401]-Fc P26A, huOPG[22-401]-Fc Y28F, huOPG[22-401], huOPG[27-401]-Fc, huOPG[29-401]-Fc, huOPG[32-401]-Fc, muOPG met[22-194]5k PEG, muOPG met[22-194]20 k PEG, huOPG met[22-194]P25A 5k PEG, huOPG met[22-194]P25A 20k PEG, huOPG met[22-194]P25A 31k PEG, huOPG met[22-194]P25A 57k PEG, huOPG met[22-194]P25A 12k PEG, huOPG met[22-194]P25A 20k PEG ramificado, huOPG met[22-194]P25A 8k PEG dímero, huOPG met[22-194]P25A entrelazamiento con disulfuro, OPG[22-194]-Fc, OPG[22-201]-Fc, OPG[22-194]-Fc Δ C, OPG[22-201]-Fc Δ

C, OPG[22-194]-FcG₁₀, metFc Δ C-OPG[22-194], OPG[22-194]-Fc Δ C, OPG[22-194]-FcG₁₀, Fc Δ C-OPG[22-194], metFc Δ C-OPG[22-194], metFc Δ C-22-194, OPG[22-194]-Fc, OPG[22-194]-Fc Δ C, metOPG[22-194], metOPG[22-201], OPG[22-293], OPG[22-401] y metFc Δ C-22-194.

5 El OCIF o un análogo o variante del mismo de la presente invención, puede contener una cadena de azúcar como parte de la molécula. Cualquier OCIF producido en forma natural o un análogo del mismo, u OCIF recombinante o análogo o variante del mismo, puede contener una cadena de azúcar que se une al OCIF o análogo o variante del mismo, después de la

10 traducción. El OCIF producido en forma natural, o un análogo del mismo que contenga una cadena de azúcar, se puede obtener de cultivos de células, tejidos, órganos, fluidos corporales, o líneas de células derivadas de humanos o animales no humanos usando técnicas convencionales. OCIF recombinante o un análogo o variante del mismo que contenga una cadena de azúcar, se

15 puede obtener de un cultivo de una célula hospedera eucariótica transformada usando un vector que comprenda una secuencia de nucleótidos que codifique para cualquier OCIF o un análogo o variante del mismo, tales como los descritos y ejemplificados anteriormente. Ejemplos de células hospederas adecuadas que se pueden usar y que son capaces de la modificación de post-

20 traducción de OCIF o un análogo o variante del mismo para unir una cadena de azúcar, incluyen células de ovario de hámster chino y células COS [Yasuda, H. et al, Endocrinology, 139, 1329-1337 (1998). El OCIF o un análogo o variante del mismo que contenga dicha cadena de azúcar, es adecuado para su uso en la formación de los complejos de la presente

25 invención.

Si, por otra parte, se desea producir un OCIF recombinante o un análogo o variante del mismo que no tenga una cadena de azúcar que haya sido añadida como una modificación de post-traducción, entonces las células

hospederas preferidas son células procarióticas tales como *Escherichia coli*.

El polisacárido que se usa en la formación de los complejos de la presente invención, es un polímero (glucano) producido por el enlace glucosídico de dos o más monosacáridos, y es de preferencia un
5 heteropolisacárido (heteroglucano) que consiste de por lo menos dos tipos diferentes de monosacárido. Cualquier polisacárido, ya sea que ocurra en forma natural o sea sintético, se puede usar potencialmente en el complejo de la presente invención.

En la presente invención, un derivado de un polisacárido es un
10 polisacárido en donde por lo menos una parte de dicha molécula de polisacárido es sustituida por una o más moléculas y/o residuos diferentes de un sacárido o azúcar. Derivados preferidos incluyen ésteres de ácido de polisacáridos, y particularmente preferidos son los ésteres de sulfato de polisacáridos.

15 Ejemplos de polisacáridos naturales adecuados para su uso en la formación de los complejos de la presente invención, incluyen ácido hialurónico, ácido condroitinsulfúrico, ácido de dermatán, ácido de heparitina, ácido de queratán, carragenina, pectina y heparina. Ejemplos de polisacáridos sintéticos adecuados para su uso en la formación de los complejos de la
20 presente invención incluyen dextrán, mientras que ejemplos de derivados de polisacáridos sintéticos adecuados incluyen sulfato de dextrán. De los polisacáridos y derivados de los mismos, el más preferido para su uso en la formación de los complejos de la presente invención, es el sulfato de dextrán.

En la presente invención, polisacáridos y derivados de los
25 mismos tales como el sulfato de dextrán, incluyen sales del mismo. La sal más preferida del sulfato de dextrán, es la sal sódica del mismo. Ejemplos de sales sódicas de sulfato de dextrán, incluyen sal sódica azufre 5 de sulfato de dextrán (referida en lo sucesivo como DS5, fabricada por Meito Sangyo Co.,

Ltd.), y sal sódica 5000 de sulfato de dextrán y sal sódica 10000 de sulfato de dextrán (ambas fabricadas por Wako Pure Chemical Industries, Ltd.).

El peso molecular de un sulfato de dextrán se calcula como sigue:

5 1) Medición del peso molecular del dextrán

El peso molecular del dextrán se puede calcular de acuerdo con la formulación de Sato mostrada a continuación [véase, por ejemplo, Manual for Pharmacopoeia of Japan, treceava revisión, publicada por Hirokawashoten (1998), la entrada tratando sobre dextrán 40], con base en la medición de la
10 viscosidad limitativa de dicho dextrán.

$$\text{Viscosidad limitativa} = 9.00 \times 10^{-4} \times \text{peso molecular}^{0.50}$$

2) Medición del contenido de azufre

El contenido de azufre en el sulfato de dextrán de interés, se puede medir como un por ciento en peso mediante cualquier técnica
15 convencional conocida en la materia, por ejemplo, el método descrito en la entrada que trata sobre la sal sódica azufre 5 de sulfato de dextrán en la Farmacopea de Japón [catorceava revisión, publicada por Jihou (2001)].

Aunque el peso molecular de la glucosa, la cual es una unidad de dextrán, es de 180, el peso molecular real de la unidad de glucosa en una
20 molécula de dextrán es de 162, este valor siendo obtenido restando el peso molecular de agua de 180, debido a que unidades de glucosa adyacentes se unen entre sí mediante un enlace α -1,6 glucosídico en la molécula de dextrán. Un átomo de hidrógeno es reemplazado por un grupo sulfato de sodio (SO_3Na : un gramo equivalente = 103) en cada unidad de glucosa de un
25 sulfato de dextrán que es sustituido de esta forma. Usando esta información, el grado de sustitución de una molécula de sulfato de dextrán (referido en lo sucesivo como el "grado de sustitución") se puede determinar a partir de la siguiente fórmula:

Contenido de azufre (% en peso) = $[32 \times \text{grado de sustitución} / (162 + 102 \times \text{grado de sustitución})] \times 100$.

3) Cálculo del peso molecular de un sulfato de dextrán

Puesto que, como se indicó anteriormente, el peso molecular real de la unidad de glucosa en la cadena de dextrán es de 162, el peso molecular de un sulfato de dextrán se puede calcular a partir de esta información, y se determina el grado de sustitución en el inciso 2) anterior usando la siguiente fórmula:

Peso molecular de sulfato de dextrán = peso molecular de dextrán $\times (162 + 102 \times \text{grado de sustitución}) / 162$.

Se sabe que los polisacáridos exhiben una distribución de pesos moleculares, por ejemplo, cada tipo diferente de sulfato de dextrán exhibe una cierta distribución de peso molecular. El peso molecular de cualquier polisacárido que se usa en la formación de los complejos de la presente invención, se da como un peso molecular promedio. El peso molecular promedio de los polisacáridos que se usan en la presente invención, de ninguna manera es limitado. La escala del peso molecular promedio del derivado de polisacárido más preferido de la presente invención, sulfato de dextrán, es por lo general de 1500 a 12000, y es más preferiblemente de 1800 a 6000. El peso molecular (promedio $\pm$ desviación estándar) de DS5, es de aproximadamente 1950 ± 70 ($n = 7$). El grado de sustitución de azufre (promedio $\pm$ desviación estándar) de DS5, calculado como se describió anteriormente, es de aproximadamente 0.32 ± 0.01 ($n = 7$). El peso molecular promedio de la sal sódica 5000 de sulfato de dextrán y de la sal sódica 10000 de sulfato de dextrán, es de aproximadamente 5000 y de aproximadamente 10,000, respectivamente. Los polisacáridos que se usan en la preparación de los complejos de la presente invención, se pueden usar con o sin alguna purificación y/o fraccionamiento adicional de los mismos, antes de su uso. En

79
29

la presente invención, los polisacáridos o derivados de los mismos no incluyen ninguna cadena de azúcares que esté unida al OCIF recombinante o análogos o variantes del mismos o al OCIF producido naturalmente o análogos o variantes del mismo posterior a la translación y/o en forma endógena en
5 células o tejidos o cuerpos de humanos o animales no humanos.

La relación molecular de la sustancia seleccionada del grupo que consiste de OCIF, análogos del mismo y variantes del mismo: la sustancia seleccionada del grupo que consiste de polisacáridos y derivados de los mismos en el complejo de la presente invención variará, dependiendo de
10 varios factores que incluyen la identidad de los componentes de dicho complejo y las condiciones bajo las cuales se prepara el mismo. No existe limitación particular sobre la relación molecular de la sustancia seleccionada del grupo que consiste de OCIF, análogos del mismo y variantes del mismo: la sustancia seleccionada del grupo que consiste de polisacáridos y derivados
15 de los mismos en los complejos de la presente invención. En los complejos preferidos de la presente invención que comprenden una sustancia seleccionada del grupo que consiste de OCIF, análogos del mismo y variantes del mismo y sulfato de dextrán, la relación molecular de dicha sustancia seleccionada del grupo que consiste de OCIF, análogos del mismo y variantes
20 del mismo: sulfato de dextrán, es de 1:1 a 1:10; más preferiblemente, la relación molecular es de 1:1 a 1:8; aún más preferiblemente, la relación molecular es de 1:1 a 1:5; y muy preferiblemente, la relación molecular es de 1:1.1 a 1:4.5.

Como ya se mencionó anteriormente, el OCIF o un análogo o
25 variante del mismo, puede existir como un monómero o puede formar dímeros, de modo que el OCIF o un análogo o variante del mismo presente en los complejos de la presente invención, puede ser un homodímero o un heterodímero, o puede ser un homooligómero, heterooligómero,

homopolímero o heteropolímero que comprenda más de dos unidades monoméricas de OCIF, un análogo del mismo o una variante del mismo (véase, por ejemplo, el documento US 6,369,027). La relación molecular de la sustancia seleccionada del grupo que consiste de OCIF, análogos del mismo y variantes del mismo: la sustancia seleccionada del grupo que consiste de polisacáridos y derivados de los mismos en un complejo que comprende OCIF o un análogo o variante del mismo, y polisacáridos o un derivado de los mismos de conformidad con la presente invención, se calcula como el número de moléculas de polisacárido o derivado del mismo por unidad monomérica de OCIF, variante del mismo o análogo del mismo.

El número de moléculas de polisacárido o derivado del mismo en un complejo de la presente invención de preferencia puede determinarse de la manera siguiente. El contenido de azúcar neutral del complejo probado [designado como (x)] y el de una muestra de referencia que sólo contiene el OCIF libre que no está en complejo o análogo o variante del mismo [designado como (y)] se cuantifican utilizando el método de ácido fenol sulfúrico (el cual se describe con detalle dentro de la presente solicitud). La cantidad de polisacárido o derivado del mismo que está unido a OCIF o un análogo o variante del mismo en el complejo probado entonces es determinada sustrayendo (y) de (x). Utilizando la cifra así obtenida, el número de moléculas de polisacárido o derivado del mismo que están unidas a OCIF o un análogo o variante del mismo se calcula de acuerdo con (I) o (II) a continuación:

(I) La cifra obtenida para la cantidad de polisacárido o derivado del mismo que está unido a OCIF o un análogo o variante del mismo se divide entre el peso molecular promedio de dicho polisacárido o derivado del mismo. La cifra resultante representa el número total de moléculas de polisacárido o derivado del mismo en el complejo de prueba.

(II) La cifra obtenida para la cantidad de polisacárido o derivado

del mismo que está unido a OCIF o un análogo o variante del mismo se divide entre la cantidad (mg) de dicho OCIF, análogo o variante del mismo en dicho complejo. La cifra resultante, que es la cantidad de polisacárido o derivado del mismo por 1 mg de OCIF, análogo o variante del mismo en el complejo, entonces se utiliza para calcular el número de moléculas de polisacárido o derivado del mismo por una molécula de OCIF, análogo o variante del mismo sobre la base del peso molecular promedio de dicho polisacárido o derivado del mismo y el peso molecular de dicho OCIF, análogo o variante del mismo [por ejemplo, de conformidad con el ejemplo 4(d) más adelante].

10 El número de moléculas de OCIF o un análogo o variante del mismo en un complejo de la invención de preferencia puede determinarse utilizando una técnica de ensayo inmunológico, tal como se describe dentro de la presente solicitud.

Uná característica preferida de los complejos de la presente invención que se pueden usar para caracterizarlos, es su afinidad por la heparina. La heparina es un polisacárido que comprende D-glucosamina, ácido D-glucurónico y ácido D-idurónico que es parcial o completamente derivado con grupos sulfato y acetilo. Una característica preferida de los complejos de la presente invención, es que la fuerza de adsorción de dicho complejo de OCIF o un análogo o variante del mismo a la heparina, es menor que la fuerza de adsorción del OCIF libre, sin combinar, o análogo o variante del mismo. El grado de adsorción se puede determinar usando una columna empacada con perlas de agarosa altamente entrelazadas sobre las cuales la heparina ha sido inmovilizada (por ejemplo, heparina obtenida de mucosa intestinal de bovino). Columnas adecuadas de este tipo incluyen columna HP de heparina HiTrap, heparina 16/10 HiPrep y heparina Sepharose (todas obtenibles de Amersham Pharmacia). La fuerza de adsorción (la afinidad) del complejo, se puede determinar de acuerdo con cualquier método adecuado

que sea bien conocido por los expertos en la técnica, para determinar la afinidad de proteínas a polisacáridos. De preferencia, el grado de adsorción se puede determinar comparando la cantidad del complejo que se une a la columna de heparina bajo condiciones de baja resistencia iónica, pero que se eluye de dicha columna bajo condiciones de alta resistencia iónica, con la cantidad de complejo que no se une a la columna de heparina bajo condiciones de baja resistencia iónica (la resistencia iónica se puede ajustar usando la sal de un ácido fuerte tal como cloruro de sodio). De esta manera, típicamente el grado de adsorción del complejo a la heparina se puede determinar de la siguiente manera:

(a) Una columna empacada con un soporte tal como perlas de agarosa entrelazadas sobre las cuales la heparina ha sido inmovilizada, es equilibrada con un regulador de pH que tiene una resistencia iónica relativamente baja (por ejemplo, regulador de pH de fosfato de sodio que contiene cloruro de sodio a 0.1-0.8 M).

(b) El complejo de la presente invención que está siendo puesto a prueba, se disuelve en el mismo regulador de pH de baja resistencia iónica usado en (a) y se aplica a la columna, y entonces se recoge un primer eluato (eluido) (fracción A).

(c) La columna se lava entonces adicionalmente con el mismo regulador de pH de baja resistencia iónica usado en el paso (a), y se recoge un segundo eluato (fracción B).

(d) La columna se lava entonces con un regulador de pH que tenga una resistencia iónica relativamente alta (por ejemplo, regulador de pH de fosfato de sodio que contiene cloruro de sodio a 1.0-2.0 M), y se recoge entonces un tercer eluato (fracción C).

(e) Se determina entonces la cantidad del complejo presente en cada una de las fracciones A, B y C [designadas como (a), (b) y (c),

respectivamente] (por ejemplo, mediante un inmunoensayo).

(f) El grado de adsorción del complejo a la heparina se determina entonces de acuerdo con la siguiente fórmula:

$$\text{Grado de adsorción} = \frac{(c)}{(a) + (b) + (c)}$$

5

Cuanto mayor es la resistencia de la unión del complejo a la columna, mayor es el valor de (c) (ya que sólo puede ser removido de la columna usando eluentes que tengan una resistencia iónica relativamente alta) y, por lo tanto, mayor es el grado de adsorción. El grado de adsorción de los complejos de la presente invención, medido mediante la fórmula anterior, variará hasta cierto grado, dependiendo del tipo de columna de heparina y las condiciones bajo las cuales se lleva a cabo la determinación. Sin embargo, el grado de adsorción de OCIF libre, sin combinar, es siempre de alrededor de 1.0, mientras que el grado de adsorción de los complejos de OCIF de la presente invención es menor de 1.0, demostrando de esta manera que la fuerza de unión de los complejos que comprenden OCIF o un análogo o variante del mismo de la presente invención a la heparina, es más débil que la fuerza de unión del OCIF libre, sin combinar, o análogo o variante del mismo (por ejemplo, usando heparina de porcino inmovilizada sobre perlas de agarosa, tal como una columna HP de heparina HiTrap, primera y segunda eluciones con regulador de pH de fosfato de sodio a 10 mM conteniendo cloruro de sodio a 0.7 M, y una tercera elución con regulador de pH de fosfato de sodio a 10 mM conteniendo cloruro de sodio a 2.0 M, el grado de adsorción de los complejos de la presente invención que comprenden OCIF o una variante del mismo o un análogo del mismo, no es mayor de 0.7, de preferencia no mayor de 0.6, y en particular de preferencia no mayor de 0.5).

Otra característica preferida de los complejos de la presente invención que se pueden usar para caracterizarlos, es la relación del número

de moléculas de OCIF o un análogo o variante del mismo presente en dicho complejo, medido mediante una técnica de prueba inmunológica (por ejemplo, ELISA): el número de moléculas de OCIF o un análogo o variante del mismo presente en dicho complejo, medido mediante una técnica para medir la cantidad total de proteína presente en dicho complejo [véase, por ejemplo, el método de Lowry: Lowry, O. H. *et al.*, J. Biol. Chem., 193, 265-275 (1951), absorbancia (λ de 280 nm), tinción con plata o el método de BCA].

El número de moléculas de OCIF o un análogo o variante del mismo presente en dicho complejo, medido mediante una técnica de prueba inmunológica, se puede determinar usando, por ejemplo, la técnica de ELISA. Los anticuerpos para su uso en la unión a la fase inmovilizada y para marcación con una enzima de reportero tal como peroxidasa en ELISA, son cualquier anticuerpo para el OCIF o análogo o variante del mismo de interés, que sea adecuado para dicho propósito. Por ejemplo, anticuerpos adecuados para unión a la fase sólida incluyen OI-26 purificado a partir de un cultivo de un hibridoma que produce anticuerpo OI-26 (FERM BP-6421) y OI-19 purificado a partir de un cultivo de un hibridoma que produce anticuerpo OI-19 (FERM BP-6420), mientras que anticuerpos adecuados para su uso como el anticuerpo marcado con una enzima de reportero en la fase móvil, incluyen anticuerpo monoclonal OI-4 de OCIF anti-humano purificado a partir de un cultivo de un hibridoma que produce anticuerpo OI-4 (FERM BP-6419) marcado con peroxidasa. Un procedimiento típico para medir el número de moléculas de OCIF o un análogo o variante del mismo en un complejo, es el siguiente:

(a) Se usan concentraciones conocidas del OCIF libre, sin combinar, para producir una curva de calibración.

(b) Se lleva a cabo una técnica de ELISA en el complejo de interés, y se usa entonces la curva de calibración para determinar la

concentración de OCIF.

(c) Usando la información obtenida en (b) y el peso molecular del monómero de OCIF, se calcula el número de moléculas de OCIF en el complejo puesto a prueba.

5 El número de moléculas de OCIF o un análogo o variante del mismo presente en dicho complejo, medido mediante una técnica para medir la cantidad total de proteína presente en dicho complejo se puede determinar usando, por ejemplo, el método de Lowry. Un procedimiento típico es el siguiente:

10 (a) Se usan concentraciones conocidas de albúmina de suero de bovino para producir una curva de calibración.

(b) Se usa entonces el método de Lowry para determinar la concentración total de proteína en el complejo que se va a poner a prueba, la curva de calibración siendo usada para determinar la concentración de OCIF.

15 (c) Usando la información obtenida en (b) y el peso molecular del monómero de OCIF, se calcula el número de moléculas de OCIF en el complejo puesto a prueba.

La relación real varía, dependiendo del tipo de técnica de inmunoensayo usado, y/o la técnica usada para medir el contenido total de
20 proteína. Una modalidad preferida de la presente invención, comprende un complejo de un OCIF que se origina de humano o un análogo o variante del mismo con sulfato de dextrán, en donde la relación del número de moléculas de dicho OCIF o análogo o variante del mismo presente en dicho complejo, según se determina mediante prueba de inmunoabsorbente ligado a enzima
25 (ELISA) usando anticuerpo monoclonal OI-19 de OCIF anti-humano purificado a partir de un cultivo de un hibridoma que produce anticuerpo OI-19 (FERM BP-6420) como el anticuerpo unido a la fase sólida, y anticuerpo monoclonal OI-4 de OCIF anti-humano purificado a partir de un cultivo de un hibridoma

que produce anticuerpo OI-4 (FERM BP-6419) marcado con peroxidasa en la fase móvil: el número de moléculas de OCIF o análogo o variante del mismo presente en dicho complejo, según se determina midiendo el contenido total de proteína usando el método de Lowry, es de por lo menos 0.5, pero no mayor de 1.2. Más preferiblemente, la relación es de por lo menos 0.6, pero no mayor de 1.1, y muy preferiblemente la relación es de por lo menos 0.7, pero no mayor de 1.1.

Complejos preferidos de la presente invención, incluyen los siguientes:

10 (a) un complejo en donde dicha sustancia seleccionada del grupo que consiste de OCIF, análogos del mismo y variantes del mismo es OCIF monomérico humano, que tiene un peso molecular medido mediante SDS-PAGE bajo condiciones no reductoras, de aproximadamente 60000, u OCIF dimérico humano que tiene un peso molecular de aproximadamente 120000, medido mediante SDS-PAGE bajo condiciones no reductoras, y dichos polisacáridos y derivados de los mismos se seleccionan del grupo que consiste de ácido hialurónico, ácido condroitinsulfúrico, ácido de dermatán, ácido de heparitina, ácido de queratán, carragenina, pectina, heparina, dextrán, y derivados de los mismos, la relación molecular de dicha sustancia
15 seleccionada del grupo que consiste de OCIF, análogos del mismo y variantes del mismo: dicha sustancia seleccionada del grupo que consiste de polisacáridos y derivados de los mismos, siendo de 1:1 a 1:10;

(b) un complejo en donde dicha sustancia seleccionada del grupo que consiste de OCIF, análogos del mismo y variantes del mismo, es
25 OCIF monomérico humano que tiene un peso molecular, medido mediante SDS-PAGE bajo condiciones no reductoras, de aproximadamente 60000, u OCIF dimérico humano que tiene un peso molecular de aproximadamente 120000, medido mediante SDS-PAGE bajo condiciones no reductoras, y

dichos polisacáridos y derivados de los mismos se seleccionan del grupo que consiste de sulfato de dextrán y sales del mismo, la relación molecular de dicha sustancia seleccionada del grupo que consiste de OCIF, análogos del mismo y variantes del mismo: dicha sustancia seleccionada del grupo que
5 consiste de polisacáridos y derivados de los mismos, siendo de 1:1 a 1:10;

(c) un complejo en donde dicha sustancia seleccionada del grupo que consiste de OCIF, análogos del mismo y variantes del mismo, es OCIF monomérico o dimérico humano, en el cual dicho monómero o una de las unidades de dicho dímero de OCIF comprende los aminoácidos +1 a +380 de
10 SEQ. ID. NO. 1 del listado de secuencias, y dicho derivado de polisacárido es una sal sódica de sulfato de dextrán que tiene un peso molecular promedio de 1500 a 12000, la relación molecular de dicha sustancia seleccionada del grupo que consiste de OCIF, análogos del mismo y variantes del mismo: dicha sal sódica de sulfato de dextrán, siendo de 1:1 a 1:10;

15 (d) un complejo de conformidad con (c), en donde la relación molecular de dicha sustancia seleccionada del grupo que consiste de OCIF, análogos del mismo y variantes del mismo: dicha sal sódica de sulfato de dextrán, siendo de 1:1 a 1:8;

(e) un complejo de conformidad con (c), en donde la relación
20 molecular de dicha sustancia seleccionada del grupo que consiste de OCIF, análogos del mismo y variantes del mismo: dicha sal sódica de sulfato de dextrán, siendo de 1:1 a 1:5; y

(f) un complejo de conformidad con cualquiera de (c) a (e), en donde dicho derivado de polisacárido es una sal sódica de sulfato de dextrán
25 que tiene un peso molecular promedio de 1800 a 6000.

Los complejos de la presente invención se pueden preparar usando cualquier método adecuado que favorezca la unión del polisacárido o variante del mismo al OCIF o análogo o variante del mismo. En otra

modalidad de la presente invención, se provee un método para la preparación de un complejo que comprende por lo menos una sustancia seleccionada del grupo que consiste de OCIF, análogos del mismo y variantes del mismo, el cual se une a por lo menos una sustancia seleccionada del grupo que consiste de polisacáridos y derivados de los mismos, dicho método comprendiendo los

5 pasos de incubar dicha sustancia (por lo menos una) seleccionada del grupo que consiste de OCIF, análogos del mismo y variantes del mismo, con dicha sustancia (por lo menos una) seleccionada del grupo que consiste de polisacáridos y derivados de los mismos, bajo condiciones que favorezcan la

10 formación de un complejo entre dicho OCIF, análogos del mismo o variantes del mismo y dichos polisacáridos o variantes de los mismos, y remover entonces los polisacáridos libres o variantes de los mismos que no estén unidos a dicho OCIF, análogos del mismo o variantes del mismo.

La incubación de dicha sustancia (por lo menos una)

15 seleccionada del grupo que consiste de OCIF, análogos del mismo y variantes del mismo, con dicha sustancia (por lo menos una) seleccionada del grupo que consiste de polisacáridos y derivados de los mismos, se lleva a cabo bajo cualquier condición adecuada, pero típicamente la incubación ocurre bajo condiciones acuosas. De preferencia, la incubación se lleva a cabo bajo

20 condiciones alcalinas. Más preferiblemente, la incubación se lleva a cabo a un pH de 9.5 a 12. Muy preferiblemente, la incubación se lleva a cabo a un pH de 10 a 11.

Durante la incubación, la escala de la concentración de dicho OCIF, análogo o variante del mismo en la solución acuosa no es

25 particularmente limitada, en tanto sea adecuada para permitir la formación del complejo deseado. Típicamente, la concentración máxima de dicho OCIF, análogo o variante del mismo en la solución acuosa, es de 0.1 a 0.5 mM, y la concentración mínima es de 0.001 a 0.05 mM. De preferencia, la

concentración de dicho OCIF, análogo o variante del mismo en la solución acuosa es de 0.01 a 0.2 mM, y más preferiblemente es de 0.05 a 0.1 mM. En el caso de OCIF, la concentración máxima en la solución acuosa es de 10 a 50 mg/ml, y la concentración mínima es de 0.1 a 5 mg/ml. De preferencia, la
5 concentración de OCIF en la solución acuosa es de 1 a 20 mg/ml, y más preferiblemente es de 5 a 10 mg/ml.

Durante la incubación, la escala de la concentración de dicho polisacárido o variante del mismo en la solución acuosa no es particularmente limitada, en tanto sea adecuada para permitir la formación del complejo
10 deseado. Típicamente, la concentración máxima de dicho polisacárido o derivado del mismo en la solución acuosa es de 0.1 a 0.5 M, y la concentración mínima es de 0.00005 a 0.05 M. De preferencia, la concentración de dicho polisacárido o derivado del mismo en la solución acuosa es de 0.005 a 0.25 M, y más preferiblemente es de 0.05 a 0.1 M. En el
15 caso de sal sódica azufre 5 de sulfato de dextrán, la concentración máxima de dicho polisacárido o variante del mismo en la solución acuosa es de 200 mg/ml a 1000 mg/ml, y la concentración mínima es de 0.1 a 100 mg/ml. De preferencia, la concentración de dicho polisacárido o variante del mismo en la solución acuosa es de 10 a 500 mg/ml, y más preferiblemente es de 100 a
20 200 mg/ml.

Durante la incubación, la temperatura no es particularmente limitada, en tanto sea adecuada para permitir la formación del complejo deseado. Típicamente, el límite superior de temperatura para la incubación es de 10 a 50°C, y el límite inferior de la misma es de 0 a 4°C. De preferencia, la
25 escala de temperatura es de 4 a 37°C, y más preferiblemente la escala de temperatura es de 4 a 10°C.

Como se mencionó anteriormente, el complejo de la presente invención no comprende polisacáridos libres o variantes de los mismos que no

se unan al OCIF, o un análogo o variante del mismo. El método usado para remover los polisacáridos libres y variantes de los mismos no es limitado, en tanto sea un método que se utilice convencionalmente en procedimientos tales como purificación, aislamiento y/o fraccionamiento. Ejemplos de métodos adecuados incluyen cromatografía de intercambio iónico, cromatografía de adsorción, cromatografía de separación, cromatografía de filtración en gel, cromatografía hidrofóbica, cromatografía de afinidad, cristalización, precipitación salina y ultrafiltración. De éstas, se prefieren la cromatografía de filtración en gel (referida en lo sucesivo como "filtración en gel") y la ultrafiltración, y se prefiere más la filtración en gel.

No existe limitación particular sobre el gel usado para la filtración en gel para la remoción de los polisacáridos libres o variantes de los mismos a partir del complejo deseado después de incubación, en tanto se pueda usar para la separación de la fracción que contiene al complejo deseado a partir del polisacárido libre o variantes del mismo que no se unan al OCIF. Ejemplos adecuados incluyen gel de agarosa, gel de dextrán y gel de poli(acrilamida).

Los complejos de la presente invención que comprenden por lo menos una sustancia seleccionada del grupo que consiste de OCIF, análogos del mismo y variantes del mismo, que se une a por lo menos una sustancia seleccionada del grupo que consiste de polisacáridos y derivados de los mismos, se pueden distinguir del OCIF libre, sin combinar, o análogo o variante del mismo *per se*, usando varias medidas que incluyen punto isoeléctrico, contenido de azúcar y detección inmunológica.

El punto isoeléctrico (pI) se puede medir usando cualquier técnica de electroforesis isoeléctrica convencional bien conocida por los expertos en la materia. El OCIF es una proteína básica, y su punto isoeléctrico es de aproximadamente 9. Este es significativamente mayor que el de los complejos de la presente invención que comprenden OCIF y polisacáridos y

variantes de los mismos, tal como sulfato de dextrán, de los cuales los valores típicos del punto isoeléctrico están en la región de 5 a 7. Por lo tanto, es posible distinguir fácilmente OCIF combinado y sin combinar usando esta técnica.

5 El contenido de azúcar de los complejos de la presente invención y de OCIF libre, sin combinar, o un análogo o variante del mismo, se puede medir usando cualquier técnica que se use convencionalmente para cuantificar el contenido de azúcar neutro, ejemplos típicos incluyendo el método del ácido fenolsulfúrico [M. Dubois et al., Anal. Chem., 28, 350
10 (1956)]. Puesto que el contenido total de azúcar de un complejo de la presente invención que comprende OCIF o un análogo o variante del mismo y un polisacárido o una variante del mismo es mayor que el del OCIF mismo, se pueden diferenciar entre sí.

Otro método alternativo para diferenciar OCIF libre, sin combinar,
15 o un análogo o variante del mismo a partir de los complejos de la presente invención que comprenden dicho OCIF o un análogo o variante del mismo unido a un polisacárido o una variante del mismo, consiste en cuantificar la cantidad de polisacárido o variante del mismo en cada uno, usando un anticuerpo que se une específicamente a dicho polisacárido o variante del
20 mismo.

Para medir la cantidad de proteína en un OCIF o un análogo o variante del mismo o en un complejo de la presente invención que comprende OCIF o un análogo o variante del mismo y un polisacárido o variante del mismo, se puede usar cualquier técnica usada convencionalmente para medir
25 el contenido total de proteína. Ejemplos adecuados incluyen el método de Lowry [Lowry, O. H. et al., J. Biol. Chem., 193, 265-275 (1951)], absorbancia (λ de 280 nm), tinción con plata y el método de BCA.

El OCIF libre, sin combinar, o un análogo o variante del mismo, u

OCIF o un análogo o variante del mismo presente en un complejo de la presente invención, se puede medir inmunológicamente usando un método que utilice por lo menos un anticuerpo monoclonal anti-OCIF. Ejemplos de un anticuerpo monoclonal anti-OCIF adecuado que se usa de preferencia para la

5 medición inmunológica de OCIF humano, incluyen un anticuerpo producido por el hibridoma OI-19 (FERM BP-6420), un anticuerpo producido por el hibridoma OI-4 (FERM BP-6419), y un anticuerpo producido por el hibridoma OI-26 (FERM BP-6421) (véase, por ejemplo, el documento WO-A-99/15691). Estos anticuerpos son referidos como "anticuerpo OI-19", "anticuerpo OI-4" y

10 anticuerpo OI-26", respectivamente, en la presente invención. El anticuerpo OI-19 y el anticuerpo OI-4 se unen al monómero de OCIF y dímero de OCIF con una afinidad equivalente, mientras que el anticuerpo OI-26 se une específicamente al dímero de OCIF. La medición inmunológica se puede llevar a cabo usando anticuerpos de este tipo de conformidad con cualquier

15 método bien conocido por los expertos en la técnica (véase, por ejemplo, el documento WO-A-99/15691). Ejemplos de métodos adecuados incluyen inmunoensayo de enzima (referido como "EIA"), radioinmunoensayo, prueba de inmunoabsorbente ligado a enzima (ELISA) y EIA en sándwich. De éstos, se prefiere ELISA. Cuando el OCIF es de origen humano, se puede utilizar de

20 preferencia ELISA usando anticuerpo OI-19 o anticuerpo OI-26 como el anticuerpo inmovilizado, y anticuerpo OI-4 como el anticuerpo marcado con enzima. La enzima preferida que se usa para marcar el anticuerpo es peroxidasa (referida como "POD").

El hibridoma que produce anticuerpo OI-4 fue depositado

25 doméesticamente como "OI-4" en el National Institute of Bioscience and Human-Technology Agency of Industrial Science and Technology en 1-3, Higashi 1 Chome, Tsukuba-shi Ibaraki-ken 305-8566, Japón (el cual desde entonces es el International Patent Organism Depositary, National Institute of

43
45

Advanced Industrial Science and Technology at AIST Tsukuba Central 6, 1-1, Higashi 1-Chome Tsukuba-shi, Ibaraki-ken 305-8566, Japón), el 16 de octubre de 1997 (Heisei-9), y se concedió el número de deposición FERM P-16473. Fue transferido a un depósito internacional con el número de deposición

5 FERM BP-6419 el 13 de julio de 1998 (Heisei-10).

El hibridoma que produce anticuerpo OI-19 fue depositado domésticamente como "OI-19" en el National Institute of Bioscience and Human-Technology Agency of Industrial Science and Technology en 1-3, Higashi 1 Chome, Tsukuba-shi Ibaraki-ken 305-8566, Japón (el cual desde

10 entonces es el International Patent Organism Depositary, National Institute of Advanced Industrial Science and Technology at AIST Tsukuba Central 6, 1-1, Higashi 1-Chome Tsukuba-shi, Ibaraki-ken 305-8566, Japón), el 16 de octubre de 1997 (Heisei-9), y se concedió el número de deposición FERM BP-16474. Fue transferido a un depósito internacional con el número de deposición

15 FERM BP-6420 el 13 de julio de 1998 (Heisei-10).

El hibridoma que produce anticuerpo OI-26 fue depositado domésticamente como "OI-26" en el National Institute of Bioscience and Human-Technology Agency of Industrial Science and Technology en 1-3, Higashi 1 Chome, Tsukuba-shi Ibaraki-ken 305-8566, Japón (el cual desde

20 entonces es el International Patent Organism Depositary, National Institute of Advanced Industrial Science and Technology at AIST Tsukuba Central 6, 1-1, Higashi 1-Chome Tsukuba-shi, Ibaraki-ken 305-8566, Japón), el 16 de octubre de 1997 (Heisei-9), y se concedió el número de deposición FERM P-16475. Fue transferido a un depósito internacional con el número de deposición

25 FERM BP-6421 el 13 de julio de 1998 (Heisei-10) (véase el documento WO-A-99/15691).

La concentración en sangre y suero, de un complejo de la presente invención que comprende OCIF o un análogo o variante del mismo y

r4
44

un polisacárido o una variante del mismo, se puede medir de la manera siguiente: primero, dicho complejo se administra a un humano o animal no humano. Entonces, después de un tiempo definido, se recupera sangre o suero del mismo. La concentración de dicho complejo en sangre o suero se mide entonces mediante ELISA usando por lo menos un anticuerpo monoclonal anti-OCIF como se describió en otros párrafos en la presente solicitud (véase el documento WO-A-99/15691).

El complejo de la presente invención que comprende por lo menos una sustancia seleccionada del grupo que consiste de OCIF, análogos del mismo y variantes del mismo, el cual se une a por lo menos una sustancia seleccionada del grupo que consiste de polisacáridos y derivados de los mismos, es útil para tratar o prevenir enfermedades metabólicas óseas. En la presente invención, enfermedades metabólicas óseas son cualquier enfermedad que se caracteriza por una cantidad neta disminuida de hueso en el paciente que sufre de las mismas, y en las cuales es necesario suprimir la resorción ósea y/o la velocidad de resorción ósea, para tratar o prevenir dichas enfermedades. Enfermedades metabólicas óseas que se pueden tratar o prevenir mediante el complejo de la presente invención, incluyen: osteoporosis primaria (osteoporosis senil, osteoporosis postmenopáusica y osteoporosis juvenil idiopática); osteoporosis endocrina (hipertiroidismo, hiperparatiroidismo, síndrome de Cushing y acromegalia); osteoporosis que acompaña a hipogonadismo (hipopituitarismo, síndrome de Klinefelter y síndrome de Turner); osteoporosis hereditaria y congénita (osteogénesis imperfecta, homocistinuria, síndrome de Menkes y síndrome de Riley-Day); osteopenia debida a mitigación de carga por gravedad o fijación e inmovilización de extremidades; enfermedad de Paget; osteomielitis; foco infeccioso debido a pérdida de hueso; hipercalcemia que resulta de carcinoma sólido (por ejemplo, carcinoma de mama, cáncer pulmonar, cáncer renal y

cáncer prostático); una enfermedad hematológica maligna (mieloma múltiple, linfoma y leucemia); hipercalcemia idiopática; hipercalcemia que acompaña a hipertiroidismo o disfunción renal; osteopenia que resulta de medicación de esteroides; osteopenia que resulta de la administración de otros
5 medicamentos (por ejemplo, inmunosupresores tales como metotrexato y ciclosporina A, heparina y antiepilépticos); osteopenia que resulta de disfunción renal; osteopenia que resulta de una operación quirúrgica o enfermedad de órgano digestivo (por ejemplo, obstrucción de intestino delgado, obstrucción de intestino grueso, hepatitis crónica, gastrectomía,
10 cirrosis hepática biliar primaria y cirrosis hepática); osteopenia debida a diferentes tipos de reumatismo, tal como artritis reumatoide, osteoclasia; destrucción de articulación debida a diferentes tipos de reumatismo, tal como artritis reumatoide; reumatismo tipo *mucilance*; osteoartritis; pérdida de hueso periodontal; metástasis cancerosa de hueso (metástasis por osteólisis);
15 osteonecrosis o muerte de osteocitos que acompaña a lesión traumática, enfermedad de Gaucher, anemia de células falciformes, lupus eritematoso sistémico o lesión no traumática; osteodistrofia tal como osteodistrofia renal; osteopenia que acompaña a hipoalcalinofosfatemia o diabetes; osteopenia que acompaña a trastornos nutricionales o trastornos de la alimentación; y
20 otras osteopenias. Las enfermedades metabólicas óseas incluyen también caquexia debida a carcinoma sólido o metástasis cancerosa de hueso o enfermedad hematológica maligna (véase la publicación de solicitud de patente japonesa 2000-178200).

Una composición que comprende un complejo de la presente
25 invención, que comprende por lo menos una sustancia seleccionada del grupo que consiste de OCIF, análogos del mismo y variantes del mismo, el cual se une a por lo menos una sustancia seleccionada del grupo que consiste de polisacáridos y derivados de los mismos, junto con un vehículo o diluyente

farmacéuticamente aceptable, se puede administrar por lo tanto con seguridad oralmente o no oralmente a un humano o animal no humano. La forma de dosificación se puede seleccionar adecuadamente, y variará dependiendo de varios factores tales como el tipo de enfermedad que está siendo tratada, el

5 grado de dicha enfermedad, y la edad, sexo y peso del paciente. Por ejemplo, el complejo se puede administrar oralmente en forma de tabletas, cápsulas, polvos, gránulos o jarabes, se puede inyectar intravenosamente solo o en combinación con adyuvantes convencionales tales como glucosa, aminoácidos o similares, se puede inyectar intramuscularmente,

10 subcutáneamente, intracutáneamente o intraperitonealmente solo, se puede administrar transdérmicamente en forma de cataplasma, se puede administrar transnasalmente en forma de una gota nasal, se puede administrar transmucosamente o a la cavidad oral en forma de una membrana mucosa que aplica agente, o se puede administrar intrarrectalmente en forma de un

15 supositorio. Estas preparaciones se pueden formular en una forma convencional usando aditivos bien conocidos que se usan generalmente en el campo de medicina, tales como excipientes, agentes aglutinantes, desintegrantes, lubricantes, agentes saborizantes, solubilizadores, agentes de suspensión, colorantes, reguladores de pH, antisépticos, agentes gelificantes,

20 agentes tensioactivos y agentes de recubrimiento.

Cuando los complejos de la presente invención se formulan como tabletas, se puede usar cualquier vehículo conocido en la técnica. Estos vehículos incluyen, por ejemplo, excipientes tales como lactosa, azúcar blanca, cloruro de sodio, glucosa, orina, almidón, carbonato de calcio, caolín,

25 celulosa cristalina, silicato, o similares; agentes aglutinantes tales como agua, etanol, propanol, jarabe simple, solución de glucosa, solución de almidón, solución de gelatina, carboximetilcelulosa, laca, metilcelulosa, fosfato de potasio, polivinilpirrolidona, o similares; desintegrantes tales como almidón

seco, alginato de sodio, polvo de agar, polvo de laminarén, carbonato ácido de sodio, carbonato de calcio, ésteres de ácido graso de polioxietilensorbitán, laurilsulfato de sodio, monoglicérido de ácido esteárico, almidón, lactosa, o similares; inhibidores de descomposición tales como azúcar blanca, estearina, manteca de cacao, aceite hidrogenado, o similares; catalizadores de absorción tales como bases de amonio cuaternario, laurilsulfato de sodio, o similares; humectantes tales como glicerina, almidón, o similares; adsorbentes tales como almidón, lactosa, caolín, bentonita, silicato coloidal, o similares; y lubricantes tales como talco refinado, ácido esteárico, sales de metal de ácido esteárico tales como estearato de calcio y estearato de magnesio, talco, polvo de ácido bórico, polietilenglicol, o similares. Además, si se desea, las tabletas pueden ser recubiertas, por ejemplo, para formar una tableta recubierta de azúcar, una tableta recubierta de gelatina, una tableta con recubrimiento entérico, una tableta recubierta de película, una tableta de dos capas o una tableta de capas múltiples.

Cuando los complejos de la presente invención se formulan como pímulas (píldoras pequeñas), la preparación puede contener vehículos conocidos en la técnica, por ejemplo, excipientes tales como glucosa, lactosa, manteca de cacao, polvo de almidón, aceite vegetal endurecido, caolín, talco, o similares; agentes aglutinantes tales como polvo de goma arábica, goma de tragacanto, gelatina, etanol, o similares; y desintegrantes tales como laminarén, agar, o similares.

Cuando los complejos de la presente invención se formulan como un supositorio, la preparación puede contener vehículos convencionales tales como polietilenglicol, manteca de cacao, alcoholes superiores, ésteres de alcoholes superiores, gelatina, glicérido semisintetizado, o similares.

Cuando los complejos de la presente invención se formulan como inyecciones, se prefiere que la preparación en forma de una solución o

suspensión sea esterilizada y se haga isotónica con la sangre. Cuando las preparaciones están en forma de una solución, emulsión o suspensión, se puede emplear cualquier diluyente conocido y que se use convencionalmente en la técnica, siendo ejemplos agua, etanol, propilenglicol, alcohol

5 isoestearílico etoxilado, alcohol isoestearílico polioxilado y ésteres de ácido graso de polioxietilensorbitán. Además, en dichas formulaciones inyectables, las preparaciones pueden contener también sales, glucosa, glicerina, o similares, en una cantidad suficiente para mantener la isotonicidad con la sangre. Pueden contener también otros agentes que incluyen solubilizadores,

10 agentes reguladores de pH, agentes sedantes, reguladores de pH, estabilizadores y agentes de solubilización. Las inyecciones pueden ser deshidratadas por congelación después de su formulación.

Las preparaciones de la presente invención pueden contener también otros aditivos tales como agentes colorantes, conservadores,

15 perfumes, agentes saborizantes, edulcorantes u otros medicamentos.

No existe limitación específica sobre la cantidad del complejo de la presente invención que comprende por lo menos una sustancia seleccionada del grupo que consiste de OCIF, análogos del mismo y variantes del mismo, y por lo menos una sustancia seleccionada del grupo que consiste

20 de polisacáridos y variantes de los mismos que estén presentes en la composición para administración, para prevenir o tratar enfermedades metabólicas óseas, pero es usualmente de 0.1 a 70% en peso, y de preferencia de 1 a 30% en peso de la formulación completa.

La dosis del complejo de conformidad con la presente invención

25 variará, dependiendo de una variedad de factores que incluyen la condición que se va a tratar, la edad, sexo y peso corporal del paciente, y la vía de administración. Sin embargo, la cantidad administrada a un humano adulto está por lo general en una escala que tiene un límite superior de 30 a 1000 mg

49
✓

y un límite inferior de 0.001 a 0.03 mg por día. La escala preferida es de 0.03 a 30 mg por día. La cantidad administrada está generalmente en una escala que tiene un límite superior de 1 a 20 mg/kg por día y un límite inferior de 0.01 a 0.5 µg/kg por día. La escala preferida es de 0.5 µg/kg a 1 mg/kg por día. El complejo de la invención se puede administrar una vez al día, o más de una vez al día, dependiendo de factores tales como la forma de administración y la condición del paciente.

Los siguientes ejemplos, ejemplos de referencia y ejemplos de prueba, tienen el propósito de ilustrar mejor la presente invención, y de ninguna manera se pretende que limiten el alcance de la misma.

EJEMPLO 1

Preparación de complejos que comprenden OCIF y sulfato de dextrán (I)

15

1(a) Preparación de OCIF humano dimérico recombinante

Se obtuvo OCIF humano dimérico recombinante que tenía un peso molecular de aproximadamente 120000 de acuerdo con el procedimiento descrito en los ejemplos del documento EP-A-0816380 (WO-A-96/26217). A saber, pBKOCIF, un vector de plásmido que comprende una secuencia de nucleótidos que codifica para OCIF humano que contiene un péptido de señal, obtenido de la cepa transformante pBK/01F10 de *E. coli* [depositada como FERM BP-5267 bajo el tratado de Budapest en el National Institute of Bioscience and Human-Technology, Agency of Industrial Science and Technology en 1-3, Higashi 1 Chome, Tsukuba-shi Ibaraki-ken 305-8566, Japón (el cual desde entonces ha sido el International Patent Organism Depositary, National Institute of Advanced Industrial Science and Technology)], producido de acuerdo al ejemplo 11 del documento EP-A-

0816380, fue digerido con las enzimas de restricción Sall y EcoRV. Se recuperó el nucleótido que codifica para el OCIF humano que contiene un péptido de señal, el cual es equivalente al ADNc del OCIF humano, de acuerdo al procedimiento descrito en el ejemplo 14 del documento EP-A-0816380. Después de separación y purificación de dicho nucleótido, fue insertado en el vector de expresión pcDL-SR α 296 (Molecular and Cellular Biology, vol. 8, p466, 1988), y entonces fue transformada así la cepa de *E. coli* DH5 α (Gibco BRL) (véase el procedimiento descrito en el ejemplo 14 del documento EP-A-0816380). El vector recombinante denominado pSR α OCIF obtenido de esta manera, fue extraído de dicho cultivo transformante, y purificado.

Se aplicó entonces el procedimiento del ejemplo 14 del documento EP-A-0816380, para obtener el OCIF maduro humano recombinante deseado. A saber, células CHO dhFr (ATCC, CRL 9096) fueron transfectadas con el plásmido recombinante pSR α OCIF producido anteriormente y un plásmido que expresa dihidrofoliato reductasa (DHFR) (plásmido pBAdDSV descrito en el documento WO-A-92/01053), y entonces se seleccionó un transfectante que expresa DHFR. Los transformantes que expresaron grandes cantidades de OCIF, fueron clonados. Se seleccionaron los clones cuyo medio acondicionado contenía OCIF a una alta concentración, y se obtuvo el clon que expresa la cantidad más grande de OCIF, 5561. Un cultivo del clon 5561 obtenido de esta manera fue condicionado y filtrado, aplicado entonces a una columna de heparina Sepharose-FF (2.6 x 10 cm, Pharmacia Co.), y sometido a cromatografía de columna usando un gradiente lineal de cloruro de sodio como eluyente. La fracción que tiene actividad de OCIF eluida con cloruro de sodio a aproximadamente 0.6 a 1.2 M, fue aplicada entonces a una columna de afinidad (azul-5PW, 0.5 x 5.0 cm, Tosoh Co), y sometida a cromatografía de afinidad usando un gradiente lineal de

cloruro de sodio como eluente. Las fracciones eluidas fueron sometidas a electrofóresis en gel de poliacrilamida-SDS bajo condiciones reductoras y no reductoras, y las fracciones que contenían el OCIF maduro humano recombinante purificado deseado, fueron designadas para ser las que
5 produjeran las mismas bandas de proteína de rOCIF, con pesos moleculares aparentes de 60000 y 120000, como se producen en el ejemplo 14 del documento EP-A-0816380. La secuencia de aminoácidos del péptido monomérico se muestra en SEQ. ID. NO. 1 del listado de secuencias, que es idéntica a la secuencia completa de SEQ. ID. No. 4 o los aminoácidos No.1 a
10 No. 380 de SEQ. ID. NO. 5 de los documentos WO-A-96/26217 y EP-A-0816380.

Las fracciones combinadas que contenían el OCIF humano obtenido, fueron complementadas entonces con un volumen 1/100 de ácido trifluoroacético a 25%, y la mezcla resultante fue aplicada a una columna de
15 fase invertida (PROTEIN-RP, 2.0 mm x 250 mm, adquirida de YMC Co.), que había sido pre-equilibrada con acetonitrilo a 30% conteniendo ácido trifluoroacético a 0.1%. La columna fue eluida entonces con un gradiente lineal de acetonitrilo de 30% a 55% a una velocidad de flujo de 0.2 ml/min durante 50 minutos. Dos fracciones pico fueron recogidas por separado, y entonces
20 liofilizadas. La fracción que mostró una banda que tenía un peso molecular aparente de 120000 sobre SDS-PAGE bajo condiciones reductoras, se utilizó entonces en los siguientes ejemplos como el OCIF humano dimérico (véase ejemplos 17 y 18 de los documentos WO-A-96/26217 y EP-A-0816380).

25

1(b) Preparación de complejos que comprenden OCIF y sulfato de dextrán

OCIF humano dimérico purificado, preparado como se describió

en el ejemplo 1(a) anterior, fue disuelto en solución de regulador de pH de fosfato de sodio a 10 mM (pH 6.0) conteniendo cloruro de sodio a 0.15 M, para dar soluciones con una concentración de OCIF de 1.5, 2, 5, 6.5, 10, 12.5, 20 ó 50 mg/ml. Se disolvió sal sódica azufre 5 de sulfato de dextrán (fabricada por Meito Sangyo Co., Ltd., referida en lo sucesivo como "DS5") en las soluciones acuosas producidas de esta manera, hasta una concentración final de 40, 100, 130, 150, 200, 400, 500, 510 ó 1000 mg/ml, y entonces se añadió a la misma hidróxido de sodio a 1 N hasta un pH final de 10, 10.5 ó 11. Las soluciones acuosas obtenidas fueron incubadas a 4, 7, 25 ó 37°C durante 1, 3, 6, 18, 24, 48, 72, 96, 144, 168 ó 288 horas.

Al término de este período, se aplicaron 4 ml de cada solución resultante a una columna de filtración en gel de grado 200 preparaciones Superdex (diámetro interior de la columna: 16 mm; longitud: 60 cm, peso molecular limitativo de exclusión: 1,300,000; fabricada por Amersham Pharmacia Biotech), previamente equilibrada con regulador de pH de fosfato de sodio a 10 mM (pH 6) conteniendo cloruro de sodio a 0.3 M, y eluida entonces con el mismo regulador de pH a una velocidad de flujo de 2 ml/min. Se monitoreó la absorción a una longitud de onda de 280 nm usando un espectrofotómetro de luz ultravioleta, y se recogió el eluato a un tiempo de retención de aproximadamente 28 a 36 minutos. El DS5 libre que no se había unido al OCIF, fue eluido a un tiempo de retención de aproximadamente 50 a 70 minutos. Todos los pasos de este procedimiento de filtración en gel se llevaron a cabo a temperatura ambiente. Las preparaciones obtenidas que contenían los complejos deseados de OCIF humano dimérico y DS5, fueron congeladas y almacenadas a -60°C. Las condiciones de preparación para cada complejo, se resumen en el cuadro 1 siguiente:

53
53

CUADRO 1

	Número de preparación	Concentración de DS5 (mg/ml)	Concentración de OCIF (mg/ml)	Temp. (°C)	pH	Tiempo de incubación (horas)
5	Prep. 1	130	6.5	4	10.5	18
	Prep. 2	510	6.5	4	10.5	18
	Prep. 3	130	6.5	4	11	18
	Prep. 4	130	6.5	4	10.5	72
	Prep. 5	500	5	4	10.5	144
	Prep. 6	130	6.5	4	10.5	48
	Prep. 7	130	6.5	4	10.5	144
	Prep. 8	130	6.5	4	10.5	288
	Prep. 9	400	20	4	10.5	18
	Prep. 10	200	10	4	10.5	18
10	Prep. 11	100	5	4	10.5	18
	Prep. 12	40	2	4	10.5	18
	Prep. 13	1000	12.5	4	10.5	18
	Prep. 14	1000	50	4	10.5	18
	Prep. 15	400	2	4	10.5	144
	Prep. 16	1000	5	4	10.5	18
	Prep. 17	1000	2	4	10.5	18
	Prep. 18	150	5	37	10.5	1
	Prep. 19	150	5	37	10.5	3
	Prep. 20	150	5	37	10.5	6
15	Prep. 21	150	5	37	10.5	24
	Prep. 22	150	5	7	10.5	168
	Prep. 23	150	5	4	10	144
	Prep. 24	150	5	25	10	24
	Prep. 25	130	6.5	4	10.5	24
	Prep. 26	150	5	37	10	24
	Prep. 27	150	5	4	10.5	144
	Prep. 28	150	5	4	11	24
	Prep. 29	150	5	4	10.5	24
	Prep. 30	150	1.5	4	10.5	72
20	Prep. 31	130	6.5	25	10.5	1
	Prep. 32	130	6.5	25	10.5	3
	Prep. 33	130	6.5	25	10.5	6
	Prep. 34	130	6.5	25	10.5	24
	Prep. 35	130	6.5	25	10.5	168
	Prep. 36	130	6.5	25	10.5	288
	Prep. 37	150	5	4	10.5	96
	Prep. 38	150	5	4	10.5	288
	Prep. 39	130	6.5	25	10.5	18
	Prep. 40	130	6.5	37	10.5	18

1(c) Preparación de OCIF humano natural

25 Se preparó OCIF humano producido en forma natural de acuerdo al procedimiento descrito en los ejemplos 1 a 4 de los documentos WO-A-96/26217 y EP-A-0816380 a partir de un cultivo de fibroblastos IMR-90 (ATCC-CCL186) de pulmón fetal humano.

Número de preparación	Concentración de DS5000 (mg/ml)	Concentración de OCIF (mg/ml)	Temp. (°C)	pH	Tiempo de incubación (horas)
Prep. 41	150	5	4	10.5	24

5

EJEMPLO 3

Medición del punto isoeléctrico

El OCIF humano dimérico recombinante purificado preparado como se describió en el ejemplo 1(a) anterior, y el complejo de OCIF y sulfato de dextrán preparado en el ejemplo 1(b) anterior y el cual es designado como número de preparación 22 en el cuadro 1, se aplicaron por separado a una minipreparación para IEF PAGE isoeléctrica de gel de electrofóresis (escala de pH de 3 a 10, fabricada por Iwaki Glass), usando un equipo de regulador de pH 3-7 IEF (Technical Frontier Co.), y se aplicó un voltaje al gel de acuerdo al siguiente régimen: 100 V durante 1 hora, seguido de 200 V durante 1 hora, y por último 500 V durante 30 minutos. Después de concluir la electrofóresis, el gel resultante obtenido en cada caso fue teñido con azul de Coomassie.

A partir de los geles de electrofóresis obtenidos anteriormente, se determinó que el punto isoeléctrico del OCIF humano dímérico era de aproximadamente 9, y el punto isoeléctrico del complejo de OCIF y sulfato de dextrán designado como número de preparación 22, era de aproximadamente 6.5, comparando la posición de banda del OCIF y la del complejo de OCIF con marcadores de pl.

25

EJEMPLO 4

Medición de la relación molecular de OCIF y sulfato de dextrán en un complejo que comprende OCIF y sulfato de dextrán

4(a) Preparación de una solución de abastecimiento de un anticuerpo monoclonal OI-4 de OCIF anti-humano marcado con peroxidasa

En este paso, anticuerpo monoclonal de OCIF anti-humano, fue marcado con peroxidasa usando un equipo de peroxidasa de rábano picante activada por maleimida enlazada a EZ (fabricado por Pierce), de acuerdo al
5 protocolo II descrito anteriormente en el folleto de instrucciones provisto con el equipo. Los detalles de este procedimiento son los siguientes:

Anticuerpo monoclonal OI-4 de OCIF anti-humano, fue purificado a partir de un cultivo de un hibridoma que produce anticuerpo OI-4 (FERM BP-
10 6419) de acuerdo al método descrito en el ejemplo 4 del documento EP-A-0974671 (WO-A-99/15691), y diluido entonces hasta una concentración final de proteína de 1 mg/ml con regulador de pH de fosfato a 10 mM (pH 7.6).

Se disolvió S-acetiltioacetato de N-succinimidilo (provisto en dicho equipo de peroxidasa de rábano picante activada por maleimida enlazada a EZ) en dimetilformamida, para dar una solución que tuviera una
15 concentración de 10 mg/ml poco antes de su uso. Se añadió una alícuota de 4 µl de la misma a 1 ml de la solución diluida preparada anteriormente que contenía OI-4, y la solución resultante se incubó entonces a temperatura ambiente durante 30 minutos. Al término de este período, se añadieron a la
20 misma 20 µl de una solución obtenida poco antes de que fuera necesaria, disolviendo 5 mg de clorhidrato de hidroxilamina en 100 µl de regulador de pH de conjugación con maleimida (provisto en dicho equipo de peroxidasa de rábano picante activada por maleimida enlazada a EZ), y la solución resultante se incubó a temperatura ambiente durante 2 horas. Al término de
25 este período, la mezcla de reacción se aplicó a una columna de desalación de poliacrilamida (10 ml, contenidos en dicho equipo de peroxidasa de rábano picante activada por maleimida enlazada a EZ), equilibrada previamente con 30 ml de regulador de pH de conjugación con maleimida (provista también en

dicho equipo), y entonces se aplicó regulador de pH de conjugación con maleimida a dicha columna. Se recogió el eluato en fracciones de 0.5 ml. Se combinaron las fracciones séptima a décima que contenían al anticuerpo. Se añadieron entonces 100 µl de una solución obtenida disolviendo 5 mg de peroxidasa de rábano picante activada por maleimida enlazada a EZ (contenida en dicho equipo de peroxidasa de rábano picante activada por maleimida enlazada a EZ) en 500 µl de agua destilada poco antes de que fuera necesaria, a las fracciones del eluato combinadas, y la mezcla resultante se incubó a temperatura ambiente durante 1 horas. Después de la incubación, se añadió a la misma un volumen igual de glicerol, y la solución obtenida de esta manera se almacenó a -20°C.

La solución obtenida mediante el procedimiento anterior, se usó como solución de abastecimiento del anticuerpo monoclonal OI-4 de OCIF anti-humano marcado con peroxidasa (referido en lo sucesivo como "POD-OI-4"), y es referida más adelante como "solución de abastecimiento de "POD-OI-4".

4(b) Cuantificación de OCIF

Se midió la cantidad de OCIF presente en los complejos preparados en los ejemplos 1 y 2 anteriores y la combinación preparada en el ejemplo de referencia 1 siguiente, mediante prueba de inmunoabsorbente ligado a enzima (ELISA), usando dos anticuerpos monoclonales anti-OCIF, siendo los detalles del procedimiento los siguientes:

Se purificó anticuerpo monoclonal OI-26 de OCIF anti-humano a partir de un cultivo de un hibridoma que produce anticuerpo OI-26 (FERM BP-6421), de acuerdo al método descrito en el ejemplo 4 del documento EP-A-0974671 (WO-A-99/15691), y se disolvió entonces en carbonato ácido de sodio a 0.1 M, para dar una solución que tuviera una concentración final de

proteína de 5 µg/ml. Una alícuota de 100 µl de la misma, fue transferida a cada cavidad de una placa de microtítulo de 96 cavidades (Maxisorp, fabricada por NUNC), y la placa fue sellada entonces e incubada a 4°C durante la noche. Al término de este período, cada cavidad fue lavada 3 veces con 250 µl de solución salina regulada en su pH con fosfato (PBS) (pH 7.4) conteniendo polisorbato 20 a 0.1%. Se añadieron a cada cavidad 20 µl de una solución de regulador de pH de dilución [comprendiendo ácido clorhídrico-TRIS a 0.2 M, Block Ace a 40% (adquirido de Dainippon Pharmaceutical Co., Ltd.) y polisorbato 20 a 0.1%; pH 7.4], y entonces la placa se mantuvo a temperatura ambiente durante 20 minutos para bloquear las áreas de la cavidad no unida por OI-26.

Las muestras por ser añadidas a las cavidades unidas a OI-26 preparadas anteriormente, fueron diluidas de preferencia con la solución de regulador de pH de dilución usada anteriormente para bloquear las cavidades. Para obtener una curva de calibración, se usó como estándar la solución de regulador de pH de dilución que contenía OCIF humano a concentraciones conocidas. La solución de regulador de pH de dilución se usó como control. Se transfirieron 50 µl de cada muestra a cada cavidad.

Después de la adición de las muestras a las cavidades, se añadieron a cada cavidad 50 µl de una solución obtenida diluyendo la solución de abastecimiento de POD-OI-4 [preparada como se describió en el ejemplo 4(a) anterior] 1500 veces el volumen con una solución de regulador de pH de dilución [ácido clorhídrico-TRIS a 0.2 M, Block Ace a 40% (adquirido de Dainippon Pharmaceutical Co., Ltd.), polisorbato 20 a 0.1% (pH 7.4)], y la placa se incubó entonces a temperatura ambiente durante 2 horas. Al término de este período, cada cavidad fue lavada 4 veces con 250 µl de regulador de pH de fosfato que contenía polisorbato 20 a 0.1% (referido en lo sucesivo como "PB", pH 7.4).

Se mezclaron ácido cítrico a 0.1 M y fosfato ácido disódico a 0.2 M, y se usaron como una solución de sustrato (pH 4.5). Una alícuota de 32.5 ml fue transferida a un tubo de prueba, y se añadieron a la misma 6.5 µl de peróxido de hidrógeno. Se disolvieron entonces 13 mg de una tableta de diclorhidrato de o-fenilendiamina (OPD) (fabricada por Wako Pure Chemical Industries, Ltd.), en la solución resultante. Se añadió una alícuota de 100 µl de la misma a cada cavidad, la placa fue cubierta con hoja de aluminio, y fue incubada entonces a temperatura ambiente durante 15 minutos. Al término de este período, se añadieron a cada cavidad 50 µl de una solución interruptora de reacción que comprendía agua purificada y ácido sulfúrico concentrado a una relación de 250:50 en volumen. Después de agitar suavemente las soluciones en las cavidades con un agitador (mezclador de título MB-1: fabricado por Japan Trika), se midió la absorbancia de cada cavidad a una longitud de onda de 490 nm mediante el uso de un lector de microplaca (SPECTRA FLUOR: fabricado por TECAN).

Con base en la curva de calibración obtenida como se explicó anteriormente a partir de la absorbancia de soluciones estándar de OCIF humano a concentraciones conocidas, se calculó la cantidad de OCIF humano en cada muestra.

20

4(c) Cuantificación de sulfato de dextrán

Se midió la cantidad de sulfato de dextrán en cada complejo producido como se describió en los ejemplos 1 y 2 anteriores como un azúcar neutro mediante el método de ácido fenolsulfúrico, cuyos detalles son los siguientes:

25

Se preparó una solución que tuviera una concentración conocida en la escala de 10 a 60 µg/ml de DS5 (fabricada por Meito Sangyo Co., Ltd.) o DS5000 (fabricada por Wako Pure Chemical Industries, Ltd.), usando una

solución de dilución (ácido cítrico a 0.01 M, cloruro de sodio a 0.3 M, solución acuosa de polisorbato 80 a 0.01%: pH 6.0), y se usó como solución estándar. Se transfirieron 0.2 ml de cada una de las soluciones estándar, de muestra o de dilución, a cada tubo de prueba. Se añadieron a las mismas 0.2 ml de 50 mg/ml de fenol acuoso, y se agitaron rápidamente. Después de incubar la mezcla resultante a 60°C durante 20 segundos en un baño de agua, se añadió a la misma 1 ml de ácido sulfúrico concentrado. Después de agitación suave pero rápida, el tubo fue incubado durante 10 minutos a temperatura ambiente, se agitó de nuevo rápidamente, y se incubó entonces durante 20 minutos a temperatura ambiente. Al término de este período, se midió la absorbancia de la solución en el tubo a una longitud de onda de 490 nm usando un espectrofotómetro (UV-240: fabricado por Shimadzu Seisakusho, K. K.).

A partir de esta absorbancia y una curva de calibración, se determinó el contenido de azúcar neutro. El OCIF humano contiene una cadena de azúcar. Por lo tanto, la cantidad de sulfato de dextrán unido a OCIF humano en la preparación que se estaba analizando, se calculó deduciendo el valor del contenido de azúcar neutro de OCIF humano mismo del medido para cualquiera de las preparaciones que se estaban analizando.

20 4(d) Cálculo de la relación molecular de OCIF y sulfato de dextrán en un complejo que comprende OCIF y sulfato de dextrán

Se dividió la cantidad de sulfato de dextrán presente en la preparación que se estaba analizando, determinada como se describió en el ejemplo 4(c) anterior, entre la cantidad de OCIF humano presente en la preparación que se estaba analizando, determinada como se describió en el ejemplo 4(b) anterior, para dar la cantidad de sulfato de dextrán presente por 1 mg de OCIF humano en la preparación que se estaba analizando.

La cifra obtenida de esta manera se usó entonces para calcular

la relación molecular de OCIF como monómero y sulfato de dextrán en la preparación que se estaba analizando, calculando el número de moléculas de sulfato de dextrán por una molécula de monómero de OCIF, con base en la suposición de que el peso molecular del monómero de OCIF humano es de 60000, el peso molecular de DS5 es de 1950, y el peso molecular de DS5000 es de 5000.

Los resultados obtenidos se muestran en el cuadro 3 siguiente:

CUADRO 3

10	Complejo	Cantidad de sulfato de dextrán en el complejo (µ/mg de OCIF)	Relación molecular de OCIF como monómero y sulfato de dextrán en el complejo
	Prep. 1	48.7	1:1.5
	Prep. 2	100.2	1:3.1
	Prep. 3	39.7	1:1.2
15	Prep. 4	62.0	1:1.9
	Prep. 5	136.4	1:4.3
	Prep. 6	60.7	1:1.9
	Prep. 7	58.5	1:1.8
	Prep. 8	60.3	1:1.9
	Prep. 9	67.7	1:2.1
	Prep. 10	94.3	1:2.9
20	Prep. 11	63.6	1:2.0
	Prep. 12	60.8	1:1.9
	Prep. 13	144.9	1:4.5
	Prep. 14	116.4	1:3.6
	Prep. 15	126.9	1:4.0
	Prep. 16	145.0	1:4.5
25	Prep. 17	116.5	1:3.6
	Prep. 18	46.0	1:1.4
	Prep. 19	61.0	1:1.9

CUADRO 3 (continuación)

	Complejo	Cantidad de sulfato de dextrán en el complejo (µg/mg de OCIF)	Relación molecular de OCIF como monómero y sulfato de dextrán en el complejo
5	Prep. 20	68.3	1:2.1
	Prep. 21	110.7	1:3.4
	Prep. 22	100.3	1:3.1
	Prep. 23	65.8	1:2.1
	Prep. 24	58.2	1:1.8
10	Prep. 25	43.8	1:1.4
	Prep. 26	80.1	1:2.5
	Prep. 27	61.8	1:2.0
	Prep. 28	57.1	1:1.8
	Prep. 29	69.3	1:2.2
15	Prep. 30	77.1	1:2.4
	Prep. 31	34.5	1:1.1
	Prep. 32	53.0	1:1.7
	Prep. 33	47.4	1:1.5
	Prep. 34	62.2	1:2.0
20	Prep. 35	96.2	1:3.0
	Prep. 36	122.5	1:3.9
	Prep. 37	67.8	1:2.1
	Prep. 38	69.5	1:2.4
	Prep. 39	78.0	1:2.5
	Prep. 40	98.4	1:3.1
	Prep. 41	161.2	1:1.9

EJEMPLO 5

25 **Estabilidad de unión entre OCIF y sulfato de dextrán en complejos de**
OCIF y sulfato de dextrán

Se repitió dos veces la filtración en gel de un complejo que

comprendía OCIF y sulfato de dextrán como describió en el ejemplo 4(c) anterior, y se midió la cantidad de sulfato de dextrán presente en el complejo obtenido después de cada una de dichas filtraciones en gel. Los detalles son los siguientes:

5

5(a) Incubación de OCIF y sulfato de dextrán

Se usó el procedimiento descrito anteriormente en el ejemplo 1(b). Se disolvió OCIF humano dimérico recombinante preparado como se describió en el ejemplo 1(a) anterior, en regulador de pH de fosfato de sodio a 10 mM (pH 6.0) conteniendo cloruro de sodio a 0.15 M, para dar una solución que tuviera una concentración de OCIF de 5 mg/ml. Se disolvió DS5 en la solución obtenida de esta manera, para dar una concentración final de DS5 de 150 mg/ml, y entonces se añadió a la misma solución de hidróxido de sodio a 1 N para ajustar el pH hasta 10.5. La solución resultante se incubó entonces a 4°C durante 7 días, para dar una solución que contuviera un complejo de OCIF dimérico humano y DS5.

5(b) Primera filtración en gel

Se sometió la solución que contenía un complejo de OCIF dimérico humano y DS5 obtenida al término de la incubación en el ejemplo 5(a) anterior a filtración en gel, de acuerdo al método descrito en el ejemplo 1(b) anterior. Se recogieron las fracciones a un tiempo de retención de aproximadamente 28 a 36 minutos, mientras se eluía sulfato de dextrán libre no unido a OCIF, a un tiempo de retención de aproximadamente 50 a 70 minutos.

5(c) Medición del contenido de proteína

Se midió la cantidad de proteína presente en el complejo de acuerdo al método de Lowry [Lowry, O. H. et al., J. Biol. Chem., 193, 265-275 (1951)], de la manera siguiente:

Se disolvieron en agua 0.2 g de sulfato de cobre (II) pentahidratado (Wako Pure Chemical) hasta un volumen final de 50 ml. Se disolvieron en agua 0.4 g de tartrato de sodio dihidratado (Wako Pure Chemical) hasta un volumen final de 50 ml. Se disolvieron en agua 20 g de carbonato de sodio hasta un volumen final de 100 ml. Las tres soluciones acuosas obtenidas de esta manera se mezclaron a una relación de 1:1:2 en volumen poco antes de su uso (la solución resultante fue referida como la "solución A"). Se disolvieron en agua 10 g de dodecilsulfato de sodio (Nacalai Tesque Inc.) hasta un volumen final de 200 ml (la solución resultante fue referida como la "solución B"). Se disolvieron en agua 3.2 g de hidróxido de sodio (Wako Pure Chemical) hasta un volumen final de 100 ml (la solución resultante fue referida como la "solución C"). Las soluciones A, B y C se mezclaron a una relación de 1:2:1 en volumen poco antes de su uso.

Por separado, se mezclaron reactivo de Folin-Ciocalteu (Wako Pure Chemical) y agua a una relación de 1:5 en volumen poco antes de su uso. Se disolvieron en agua 2.76 g de ácido cítrico, sal trisódica dihidratada (Wako Pure Chemical), 0.13 g de ácido cítrico monohidratado (Wako Pure Chemical), 17.5 g de cloruro de sodio y 0.1 g de polisorbato 80, hasta un volumen final de 1 litro (pH 6.9), para dar una solución referida como la "solución de dilución".

Se añadieron 9.5 ml de solución de dilución a 500 μ l de una solución estándar de albúmina de suero de bovino (Pierce Co. Ltd.) conteniendo 2 mg/ml de albúmina de suero de bovino (referida como "BSA") en cloruro de sodio acuoso a 0.9% conteniendo azida de sodio a una concentración menor de 0.1%, para dar una solución referida como la

“solución de 100 $\mu\text{g/ml}$ de BSA”. Se añadieron 3.5 ml, 3 ml, 2.5 ml ó 2 ml de solución de dilución a 1.5 ml, 2 ml, 2.5 ml ó 3 ml de solución de 100 $\mu\text{g/ml}$ de BSA, respectivamente, para dar soluciones referidas como “solución de 30 $\mu\text{g/ml}$ de BSA”, “solución de 40 $\mu\text{g/ml}$ de BSA”, “solución de 50 $\mu\text{g/ml}$ de BSA” y “solución de 60 $\mu\text{g/ml}$ de BSA”, respectivamente. Se añadieron 3 ml de solución de dilución a 1.5 ml de solución de 60 $\mu\text{g/ml}$ de BSA, para dar una solución referida como “solución de 20 $\mu\text{g/ml}$ de BSA”.

La muestra cuyo contenido de proteínas se debía determinar, se diluyó con solución de dilución para dar una solución con una concentración final de proteína de aproximadamente 40 μg de proteína por 1 ml. Se transfirieron a un tubo de prueba 1 ml de solución de 20 $\mu\text{g/ml}$ de BSA, solución de 30 $\mu\text{g/ml}$ de BSA, solución de 40 $\mu\text{g/ml}$ de BSA, solución de 50 $\mu\text{g/ml}$ de BSA, solución de 60 $\mu\text{g/ml}$ de BSA, muestra diluida o solución de dilución ($n = 3$), y se añadieron a las mismas 1 ml de reactivo de cobre alcalino, y la solución resultante se mezcló y se incubó a temperatura ambiente durante 10 minutos. Se añadieron entonces 0.5 ml del reactivo de Folin-Ciocalteu diluido, y la solución resultante se mezcló y se incubó a temperatura ambiente durante 30 minutos. Al término de este período, se midió la absorbancia de cada mezcla a una longitud de onda de 750 nm usando una celda hecha de cuarzo cuyo ancho era de 10 mm, usando un espectrofotómetro de luz ultravioleta (Lambda 20: Perkin Elmer Co. Ltd.). Después, se calculó la cantidad de proteína contenida en la muestra con base en una curva de calibración producida usando las absorbancias de las soluciones de BSA estándar (como un valor reducido hasta una cantidad de BSA).

5(d) Cuantificación de sulfato de dextrán

Se midió la cantidad de sulfato de dextrán unido a OCIF humano

en el complejo que se había obtenido después de la primera filtración en gel en el ejemplo 5(b) anterior, usando el procedimiento descrito en el ejemplo 4(c) anterior.

5 5(e) Segunda filtración en gel

Se transfirieron las fracciones recogidas combinadas obtenidas en el ejemplo 5(b) anterior a dos unidades de filtración Centriprep (YM-30, limitación de peso molecular 30000, Millipore Amicon Co., Ltd.), y se centrifugaron a 2000 rpm durante 20 minutos usando una centrífuga
10 (himacCT60, Hitachi Seisakusho Co. Ltd.). Se recogieron y combinaron las soluciones concentradas no filtradas obtenidas de las dos unidades de filtración Centriprep. La solución resultante se sometió a filtración en gel como se describió en el ejemplo 1(b) anterior, y se recogieron y combinaron las fracciones a un tiempo de retención de aproximadamente 28 a 36 minutos.
15 Después, se midió el contenido de proteína y azúcar en el complejo presente en las fracciones combinadas como se describió en los ejemplos 5(c) y 5(d) anteriores.

 5(f) Tercera filtración en gel

20 Se transfirieron las fracciones recogidas combinadas obtenidas en el ejemplo 5(e) anterior a dos unidades de filtración Centriprep (YM-30, corte de peso molecular 30000, Millipore Amicon Co., Ltd.), y se centrifugaron a 2000 rpm durante 20 minutos usando una centrífuga (himacCT60, Hitachi Seisakusho Co. Ltd.). Se recogieron y combinaron las soluciones
25 concentradas no filtradas obtenidas de las dos unidades de filtración Centriprep. El concentrado obtenido se sometió a filtración en gel como se describió en el ejemplo 1(b) anterior, y se recogieron y combinaron las fracciones a un tiempo de retención de aproximadamente 28 a 36 minutos.

67
67

Después, se midió el contenido de proteína y azúcar en el complejo presente en las fracciones combinadas como se describió en los ejemplos 5(c) y 5(d) anteriores.

5 5(g) Cálculo de la relación molecular de OCIF: sulfato de dextrán

Se calculó la relación molecular de OCIF como monómero: sulfato de dextrán presente en el complejo contenido en las fracciones obtenidas después de la primera filtración en gel en el ejemplo 5(b) anterior, la segunda filtración en gel en el ejemplo 5(e) anterior, y la tercera filtración en
10 gel en el ejemplo 5(f) anterior, de acuerdo al ejemplo 4(d) anterior. Los resultados obtenidos se resumen en el cuadro 4 siguiente:

CUADRO 4

15

Filtración en gel	Relación molecular de OCIF como monómero: sulfato de dextrán en el complejo
Primera	1:2.2
Segunda	1:2.3
Tercera	1:2.1

20

Será inmediatamente evidente a partir de lo anterior, que la relación molecular de OCIF: sulfato de dextrán en el complejo de la presente invención, es notablemente constante en las tres filtraciones en gel, indicando el alto grado de estabilidad de la unión entre el OCIF y el sulfato de dextrán en los complejos de la presente invención.

EJEMPLO 6

25

Grado de adsorción de un complejo de OCIF y sulfato de dextrán a una columna de heparina entrelazada

6(a) Cromatografía de columna de heparina

es
68

Todos los procedimientos de cromatografía de columna en este ejemplo se llevaron a cabo a una velocidad de flujo de 4 ml por minuto.

Una columna de heparina entrelazada (columna HP de heparina HiTrap, lote 289212, Amersham Pharmacia Biotech) fue preequilibrada con 5 ml de regulador de pH de fosfato de sodio a 10 mM conteniendo cloruro de sodio a 0.7 M. Se tomó una preparación del cuadro 1 del ejemplo 1, y se diluyó hasta una concentración final de proteína de 0.1 mg/ml con regulador de pH de fosfato de sodio a 10 mM conteniendo cloruro de sodio a 0.7 M. Se aplicó 1 ml de la solución diluida obtenida de esta manera a dicha columna, y se recogió 1 ml de un primer eluato (fracción A). Después, se aplicaron 5 ml de regulador de pH de fosfato de sodio a 10 mM conteniendo cloruro de sodio a 0.7 M a dicha columna, y se recogieron 5 ml de un segundo eluato (fracción B). Por último, se aplicaron 4 ml de regulador de pH de fosfato de sodio a 10 mM conteniendo cloruro de sodio a 2 M a dicha columna, y se recogieron 4 ml de un eluato (fracción C).

6(b) Medición de la cantidad de OCIF en el eluato

Se transfirieron 100 µl de carbonato ácido de sodio a 0.1 M (pH 9.6), en el cual se disolvió un anticuerpo monoclonal OI-19 de OCIF anti-humano (FERM BP-6420), a una concentración de 10 µg por ml, a cada cavidad de una placa de microtítulo de 96 cavidades (Maxisorp: NUNC Co. Ltd.). La placa fue sellada e incubada entonces a 4°C durante la noche. Al término de este período, la solución en cada cavidad se removió mediante decantación, se añadieron a cada cavidad 300 µl de Block Ace a 50% (adquirido de Dainippon Pharmaceutical Co., Ltd.), y entonces la placa se incubó a temperatura ambiente durante 2 horas. Después de remover la solución en cada cavidad, cada cavidad fue lavada 3 veces con 300 µl de PBS (pH 7.4) conteniendo polisorbato 20 a 0.1% usando un SERA WASHER MW-

96R (Bio Tec Co. Ltd.).

Después de preparar las cavidades como se describió anteriormente, se diluyeron 20 µl de cada uno de los tres eluatos (fracciones A, B y C) obtenidos en el ejemplo 6(a) anterior, hasta un volumen final de 120 µl con HCl-TRIS a 0.2 M (pH 7.4) conteniendo Block Ace a 40%, 10 µg/ml de inmunoglobulina G de ratón y polisorbato 20 a 0.1%, y se diluyeron entonces con el mismo volumen de agua pura. Al mismo tiempo, se disolvió una cantidad conocida de OCIF humano en 120 µl de HCl-TRIS a 0.2 M (pH 7.4) conteniendo Block Ace a 40%, 10 µg/ml de inmunoglobulina G de ratón y polisorbato 20 a 0.1%, y se diluyó entonces con el mismo volumen de agua pura. La solución obtenida de esta manera se usó como estándar.

Se añadieron 100 µl de cada uno de los eluatos diluidos y del estándar a una cavidad de cada una de las placas de microtítulo preparadas previamente descritas anteriormente, y entonces la placa se incubó a temperatura ambiente durante 2 horas con mezclado suave usando un mezclador de microplaca (NS-P: Iuchi Seiei-Do, Co Ltd.). Al término de este período, la solución se removi6 de cada cavidad, y entonces cada cavidad se lav6 6 veces con 300 µl de PBS (pH 7.4) conteniendo polisorbato 20 a 0.1%, usando un SERA WASHER MW-96R (Bio Tec Co Ltd.). Se añadieron entonces a cada cavidad 100 µl de HCl-TRIS a 0.1 M (pH 7.4) conteniendo Block Ace a 25%, 10 µg/ml de inmunoglobulina G de rat6n y polisorbato 20 a 0.1%, a la cual se había a6adido la soluci6n de abastecimiento de POD-OI-4 preparada en el ejemplo 4(a) anterior, para dar una soluci6n a 0.01% (volumen por volumen), y la placa se incub6 a temperatura ambiente durante 2 horas con mezclado suave usando el mismo mezclador de microplaca. Despu6s de remover la soluci6n en cada cavidad, la cavidad se lav6 6 veces con 300 µl de PBS (pH 7.4) conteniendo polisorbato 20 a 0.1% usando un SERA WASHER MW-96R (Bio Tec Co Ltd.).

Después de que las cavidades fueron lavadas, se añadieron a cada cavidad 100 µl de reactivo soluble de 3,3',5,5'-tetrametilbencidina (TMB) (Scytek Co Ltd.), y la placa se incubó entonces a temperatura ambiente durante 10 a 15 minutos con mezclado suave, usando el mismo mezclador de microplaca anterior. Al término de este período, se añadieron a cada cavidad 100 µl de regulador de pH de detención TMB (Scytek Co Ltd.). Después de mezclar la placa suavemente con el mezclador de microplaca durante aproximadamente 1 minuto, se midió la absorbancia de cada cavidad a una longitud de onda de 450 nm usando un lector de microplaca (SPECTRA THERMO: TECAN Co. Ltd.). Se calculó entonces la cantidad de OCIF contenido en cada una de las fracciones A, B y C [designadas como (a), (b) y (c)], con base en una curva de calibración preparada graficando la absorbancia de cada estándar descrito anteriormente contra la concentración. Se calculó entonces el grado de absorción del complejo de OCIF y sulfato de dextrán puesto a prueba a la columna de heparina entrelazada, de acuerdo con la fórmula siguiente:

$$\frac{(c)}{(a) + (b) + (c)}$$

Los resultados se resumen en el cuadro 5 siguiente para 7 de los complejos preparados en el ejemplo 1 anterior. Se da también el resultado correspondiente para OCIF sin combinar. Como se puede observar a partir del cuadro, el OCIF sin combinar se une más fuertemente a la columna de heparina que los complejos de la presente invención. Se encontró también que los complejos de la presente invención se pueden caracterizar además por su grado de adsorción a la columna de heparina entrelazada.

71
27

CUADRO 5

5

Preparación	Grado de adsorción del complejo de OCIF/DS a una columna de heparina entrelazada
Prep. 6	0.451
Prep. 7	0.183
Prep. 8	0.153
Prep. 22	0.264
Prep. 24	0.072
Prep. 25	0.611
Prep. 27	0.141
OCIF	0.998

10

EJEMPLO 7

Detección inmunológica de un complejo de OCIF/sulfato de dextrán

7(a) Medición de la cantidad de proteína

Se determinó la cantidad de proteína contenida en una
15 preparación compleja del ejemplo 1 anterior, de acuerdo al método descrito en
el ejemplo 5(c) anterior.

7(b) Medición inmunológica de la cantidad de OCIF

Se determinó la cantidad de OCIF contenido en una preparación
20 compleja del ejemplo 1 anterior determinada mediante medios inmunológicos,
mediante la técnica de ELISA descrita en el ejemplo 6 anterior.

7(c) Cálculo de la velocidad de detección inmunológica

25 Se dividió el valor obtenido en el ejemplo 7(b) anterior entre el
valor correspondiente obtenido en el ejemplo 7(a) anterior, y el valor resultante
obtenido de esta manera fue referido como “la velocidad de detección
inmunológica”.

72
72

Los resultados se resumen en el cuadro 6 siguiente. Se da también el resultado correspondiente para OCIF sin combinar. Se encontró también que los complejos de la presente invención se pueden caracterizar además por su velocidad de detección inmunológica.

5

CUADRO 6

Preparación	Velocidad de detección inmunológica del complejo de OCIF/DS
Prep. 6	1.07
Prep. 7	0.74
Prep. 8	0.88
Prep. 22	1.06
Prep. 24	1.02
Prep. 25	0.87
Prep. 27	1.04
OCIF	1.06

10

EJEMPLO DE REFERENCIA 1

Preparación de una combinación de OCIF y sulfato de dextrán

15

Se preparó una combinación de OCIF y sal sódica de sulfato de dextrán (peso molecular de 5000 ó 10000) de la manera siguiente, usando el procedimiento descrito en el ejemplo 1 del documento EP-A-1127578 (WO-A-2000/24416).

20

Se disolvió OCIF humano dimérico purificado teniendo un peso molecular de aproximadamente 120000, preparado como se describió en el ejemplo 1(a) anterior, en solución de regulador de pH de fosfato de sodio a 10 mM (pH 6.0) conteniendo cloruro de sodio a 0.15 M y polisorbato 80 a 0.01%, para dar una solución que tuviera una concentración de OCIF de 0.25 mg/ml. Se disolvió DS5000 (fabricado por Wako Pure Chemical Industries, Ltd.) descrito en el ejemplo 2 anterior, o sal sódica de sulfato de dextrán teniendo un peso molecular de 10000 (fabricada por Wako Pure Chemical Industries,

25

73
73

Ltd., referida en lo sucesivo como "DS10000"), en la solución acuosa resultante, para dar una solución que tuviera una concentración final de la sal sódica de sulfato de dextrán de 1 ó 4 mg/ml, y entonces se añadió a la misma hidróxido de sodio para dar un pH final de 7. Las soluciones acuosas
5 obtenidas de esta manera se incubaron a 4°C durante 24 horas, para dar las preparaciones deseadas que contuvieran OCIF y DS5000 o DS10000, las cuales se usaron entonces con fines de comparación en el ejemplo de prueba 1 anterior.

Las condiciones de preparación para cada combinación se
10 resumen en el cuadro 7 siguiente:

FE
26

CUADRO 7

Número de preparación de referencia	Sulfato de dextrán		Concentración de OCIF (mg/ml)	Temp. (°C)	pH	Tiempo de incubación (horas)
	Tipo	Conc. (mg/ml)				
Prep. de ref. 1	DS5000	4	0.25	4	7	24
Prep. de ref. 2	DS10000	1	0.25	4	7	24

5

EJEMPLO DE PRUEBA 1

Medición de la concentración en suero de complejos que comprenden
OCIF y sulfato de dextrán

10

1(a) Inyección y colecta de sangre

Se hizo que se abstuvieran de alimentarse durante la noche ratas hembras Wistar de 5 semanas (teniendo un peso corporal de aproximadamente 100 g). Se diluyó la preparación de OCIF y sulfato de dextrán preparada en el ejemplo 1, ejemplo 2 ó ejemplo de referencia 1 que debía ser puesta a prueba, hasta una concentración de 0.25 mg/ml con PBS (pH 7.4) conteniendo polisorbato 80 a 0.01%, para preparar una solución inyectable, la cual se administró entonces a la cola de una de las ratas de prueba mediante una vena en una sola dosis a un nivel inyectado de 2 ml/kg de peso corporal. Seis horas después de la administración, se extrajo sangre del corazón de la rata.

20

1(b) Fraccionamiento del suero

Después de dejar que la sangre recogida en el ejemplo 1(a) anterior se coagulara a temperatura ambiente durante 30 minutos, se obtuvo suero de la misma como sobrenadante mediante centrifugación de la sangre a 14000 rpm durante 3 minutos, usando un rotor con un diámetro de 10 cm.

25

75
25

1(c) Cuantificación de OCIF en el suero

100 µl de una solución en donde se disolvió anticuerpo monoclonal OI-19 de OCIF anti-humano (véase el documento EP-A- 0974671/WO-A-99/15691) en solución de carbonato ácido de sodio a 0.1 M hasta una concentración final de OCIF de 10 µg/ml, se añadieron a cada cavidad de una placa de microtítulo de 96 cavidades (Maxisorp: fabricada por NUNC), y entonces la placa fue sellada y se dejó que reposara durante la noche a 4°C. La solución de anticuerpos se removió entonces mediante decantación, y se añadieron a cada cavidad 300 µl de una solución de regulador de pH de bloqueo (Block Ace a 50%: adquirido de Dainippon Pharmaceutical Co., Ltd.), y entonces la placa se dejó reposando a temperatura ambiente durante 2 horas. Al término de este período, cada cavidad fue lavada tres veces con 300 µl de PBS (pH 7.4) conteniendo polisorbato 20 a 0.1%.

Se añadieron 100 µl de agua purificada y 120 µl de una solución de regulador de pH de dilución [composición: ácido clorhídrico-TRIS a 0.2 M, Block Ace a 40% (adquirida de Dainippon Pharmaceutical Co., Ltd.), 10 µg/ml de inmunoglobulina G de ratón y polisorbato 20 a 0.1%: pH 7.4], a 20 µl del suero que se debía poner a prueba y que fue recogido como se describió en el ejemplo 1(b) anterior, y esto se mezcló. Como control, se añadieron 100 µl de agua purificada y 120 µl de regulador de pH de dilución conteniendo dímero de OCIF humano a una concentración conocida, a 20 µl de agua destilada, y se mezclaron.

100 µl de cada una de las preparaciones de suero obtenidas de esta manera se añadieron a cada cavidad, y se dejó entonces que la placa reposara a temperatura ambiente durante 2 horas. Cada cavidad fue lavada seis veces después de que la reacción concluyó, con 300 µl de una solución

que contenía polisorbato 20 a 0.1% (pH 7.4). Se añadieron entonces a cada cavidad 100 µl de una solución obtenida diluyendo 1000 veces la solución de abastecimiento de POD-OI-4 obtenida en el ejemplo 4(a) anterior, con una solución de dilución [comprendiendo ácido clorhídrico-TRIS a 0.1 M, Block Ace a 25% (adquirida de Dainippon Pharmaceutical Co., Ltd.), 10 µg/ml de inmunoglobulina G de ratón y polisorbato 20 a 0.1% (pH 7.4)], y la placa se dejó reposando a temperatura ambiente durante 2 horas.

Al término de este período, cada cavidad fue lavada 6 veces con 300 µl de PBS (pH 7.4) conteniendo polisorbato 20 a 0.1%. Se añadieron entonces a cada cavidad 100 µl de una solución de sustrato (reactivo soluble de TMB: fabricado por Scytek), y la placa se dejó reposando a temperatura ambiente durante 10 a 15 minutos. Se añadieron entonces a cada cavidad 100 µl de una solución interruptora de reacción (regulador de pH de detención de TMB: fabricado por Scytek).

Después de agitación suave usando una máquina de agitación (mezclador de microplaca NS-P: fabricado por Iuchi Seiei-Do Co. Ltd.), se midió la absorbancia de cada cavidad a una longitud de onda de 450 nm usando un lector de microplaca (SPECTRA THERMO: fabricado por TECAN). Se calculó entonces la concentración de OCIF en el suero puesto a prueba a partir de una curva de calibración creada usando la solución de OCIF estándar. La dosis se calculó como la dosis de OCIF por kg de peso corporal (mg/kg), midiendo la concentración de OCIF en cada inyección preparada en 1(a) en forma similar al caso del suero.

25 1(d) Concentración del suero

Se cuantificó para cada muestra el OCIF en el suero obtenido en el inciso 1(b) anterior, de acuerdo al método descrito en el inciso 1(c) anterior. Los resultados se dan en el cuadro 8 siguiente:

27
45

CUADRO 8

Preparación	Dosis (mg/kg de OCIF)	Concentración del suero (ng/ml de OCIF)	Concentración en suero corregida* (ng/ml de OCIF)
Prep. 1	0.5	213	
Prep. 2	0.5	350	
Prep. 3	0.5	191	
Prep. 4	0.5	370	
Prep. 5	0.5	305	
Prep. 6	0.5	209	
Prep. 7	0.5	371	
Prep. 8	0.5	571	
Prep. 9	0.5	164	
Prep. 10	0.5	174	
Prep. 11	0.5	235	
Prep. 12	0.5	249	
Prep. 13	0.5	177	
Prep. 14	0.5	271	
Prep. 15	0.5	313	
Prep. 16	0.5	359	
Prep. 17	0.5	269	
Prep. 18	0.6	400	351
Prep. 19	0.4	526	614
Prep. 20	0.4	553	760
Prep. 21	0.1	132	611
Prep. 22	0.6	752	651
Prep. 23	0.5	340	
Prep. 24	0.5	830	
Prep. 25	0.5	165	
Prep. 26	0.5	574	
Prep. 27	0.5	584	
Prep. 28	0.5	228	
Prep. 29	0.5	231	
Prep. 30	0.5	620	
Prep. 31	0.5	338	
Prep. 32	0.5	774	
Prep. 33	0.5	879	

CUADRO 8 (continuación)

Preparación	Dosis (mg/kg de OCIF)	Concentración del suero (ng/ml de OCIF)	Concentración en suero corregida* (ng/ml de OCIF)
Prep. 34	0.5	667	
Prep. 35	0.2	318	795
Prep. 36	0.1	114	570
Prep. 37	0.5	535	
Prep. 38	0.4	631	789
Prep. 39	0.5	366	
Prep. 40	0.5	423	
Prep. 41	0.4	423	508
Prep. de ref. 1	0.5	75	
Prep. de ref. 2	0.5	24	

5 *La concentración en suero corregida es la concentración de OCIF en suero, cuando se convierte la dosis de OCIF por kg de peso corporal a 0.5 mg/kg.

10 Como se muestra en el cuadro 8, las concentraciones en suero de las preparaciones de la presente invención administradas a una dosis de 0.5 mg/kg de peso corporal, 6 horas después de la administración, fueron 2.2 a 11.7 veces mayores que las obtenidas después de la administración en la preparación de referencia 1 con la misma dosis.

15 Ventajas provistas por la invención

 Como se demostró anteriormente, los complejos de la presente invención que comprenden por lo menos un OCIF, un análogo o una variante del mismo, y por lo menos un polisacárido o una variante del mismo, son retenidos en la sangre después de su administración a una concentración
20 significativamente mayor, cuando se comparan con combinaciones conocidas que contienen OCIF y polisacáridos, tales como los que se describen en el documento WO-A-2000/24416. Los complejos de la presente invención son útiles para prevenir o tratar varias enfermedades metabólicas óseas tales como osteoporosis, hipercalcemia, metástasis lítica ósea, pérdida de hueso
25 debida a artritis reumatoide, osteopenia debida a medicación de esteroides, mieloma múltiple, osteopenia o hipercalcemia debidas a disfunción renal, osteodistrofia renal, osteoartritis, y similares.

79
29

LISTADO DE SECUENCIAS

<110> Sankyo Company, Limited

<120> Complejo que comprende FIOC y polisacárido

5 <130> EPP85710 (FP-200229SW)

<150> JP 2001-198985

<151> 2001-06-29

<160> 1

10 <170> PatentIn version 3.1

<210> 1

<211> 401

<212> PRT

<213> Homo sapiens

15 <220>

<221> Señal

<222> (-21)..(-1)

<223>

<220>

<221> mat_péptido

<222> (+1)..(+380)

20 <223>

<400> 1

Met Asn Asn Leu Leu Cys Cys Ala Leu Val Phe Leu Asp Ile Ser Ile
-20 -15 -10

Lys Trp Thr Thr Gln Glu Thr Phe Pro Pro Lys Tyr Leu His Tyr Asp
-5 -1 1 5 10

25

5

Glu Glu Thr Ser His Gln Leu Leu Cys Asp Lys Cys Pro Pro Gly Thr
15 20 25

Tyr Leu Lys Gln His Cys Thr Ala Lys Trp Lys Thr Val Cys Ala Pro
30 35 40

Cys Pro Asp His Tyr Tyr Thr Asp Ser Trp His Thr Ser Asp Glu Cys
45 50 55

Leu Tyr Cys Ser Pro Val Cys Lys Glu Leu Gln Tyr Val Lys Gln Glu
60 65 70 75

Cys Asn Arg Thr His Asn Arg Val Cys Glu Cys Lys Glu Gly Arg Tyr
80 85 90

Leu Glu Ile Glu Phe Cys Leu Lys His Arg Ser Cys Pro Pro Gly Phe
95 100 105

Gly Val Val Gln Ala Gly Thr Pro Glu Arg Asn Thr Val Cys Lys Arg
110 115 120

Cys Pro Asp Gly Phe Phe Ser Asn Glu Thr Ser Ser Lys Ala Pro Cys
125 130 135

Arg Lys His Thr Asn Cys Ser Val Phe Gly Leu Leu Leu Thr Gln Lys
140 145 150 155

Gly Asn Ala Thr His Asp Asn Ile Cys Ser Gly Asn Ser Glu Ser Thr
160 165 170

Gln Lys Cys Gly Ile Asp Val Thr Leu Cys Glu Glu Ala Phe Phe Arg
175 180 185

Phe Ala Val Pro Thr Lys Phe Thr Pro Asn Trp Leu Ser Val Leu Val
190 195 200

Asp Asn Leu Pro Gly Thr Lys Val Asn Ala Glu Ser Val Glu Arg Ile
205 210 215

Lys Arg Gln His Ser Ser Gln Glu Gln Thr Phe Gln Leu Leu Lys Leu
220 225 230 235

Trp Lys His Gln Asn Lys Asp Gln Asp Ile Val Lys Lys Ile Ile Gln
240 245 250

Asp Ile Asp Leu Cys Glu Asn Ser Val Gln Arg His Ile Gly His Ala
255 260 265

Asn Leu Thr Phe Glu Gln Leu Arg Ser Leu Met Glu Ser Leu Pro Gly
270 275 280

81
8t

Lys Lys Val Gly Ala Glu Asp Ile Glu Lys Thr Ile Lys Ala Cys Lys
285 290 295

Pro Ser Asp Gln Ile Leu Lys Leu Leu Ser Leu Trp Arg Ile Lys Asn
300 305 310 315

Gly Asp Gln Asp Thr Leu Lys Gly Leu Met His Ala Leu Lys His Ser
320 325 330

5

Lys Thr Tyr His Phe Pro Lys Thr Val Thr Gln Ser Leu Lys Lys Thr
335 340 345

Ile Arg Phe Leu His Ser Phe Thr Met Tyr Lys Leu Tyr Gln Lys Leu
350 355 360

Phe Leu Glu Met Ile Gly Asn Gln Val Gln Ser Val Lys Ile Ser Cys
365 370 375

10

Leu
380

REIVINDICACIONES

1.- Un complejo que comprende por lo menos una sustancia seleccionada del grupo que consiste de factor inhibidor de osteoclastogénesis (OCIF), análogos del mismo y variantes del mismo, caracterizado porque se une a por lo menos una sustancia seleccionada del grupo que consiste de polisacáridos y derivados de los mismos.

2.- El complejo de conformidad con la reivindicación 1, caracterizado además porque dicha sustancia seleccionada del grupo que consiste de OCIF, análogos del mismo y variantes del mismo, es de tipo natural o de tipo recombinante.

3.- El complejo de conformidad con las reivindicaciones 1 ó 2, caracterizado además porque dicha sustancia seleccionada del grupo que consiste de OCIF, análogos del mismo y variantes del mismo, es un monómero o un dímero.

4.- El complejo de conformidad con la reivindicación 3, caracterizado además porque dicha sustancia seleccionada del grupo que consiste de OCIF, análogos del mismo y variantes del mismo, es OCIF monomérico humano que tiene un peso molecular, medido mediante SDS-PAGE bajo condiciones no reductoras, de aproximadamente 60000, u OCIF dimérico humano que tiene un peso molecular de aproximadamente 120000, medido mediante SDS-PAGE bajo condiciones no reductoras.

5.- El complejo de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, caracterizado además porque dicho OCIF comprende los aminoácidos -21 a +380 de SEQ. ID. NO: 1 del listado de secuencias.

6.- El complejo de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, caracterizado además porque dicho OCIF comprende los aminoácidos +1 a +380 de SEQ. ID. NO: 1 del listado de secuencias.

7.- El complejo de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, caracterizado además porque dichos polisacáridos y derivados de los mismos se seleccionan del grupo que consiste de ácido hialurónico, ácido condroitinsulfúrico, ácido de dermatán, ácido de heparitina, ácido de queratán, carragenina, pectina, heparina, dextrán, y derivados de los mismos.

8.- El complejo de conformidad con la reivindicación 7, caracterizado además porque dichos derivados de polisacárido se seleccionan de sulfato de dextrán y sales del mismo.

9.- El complejo de conformidad con la reivindicación 8, caracterizado además porque dicho derivado de polisacárido, es una sal sódica de sulfato de dextrán.

10.- El complejo de conformidad con la reivindicación 9, caracterizado además porque el peso molecular promedio de dicho sulfato de dextrán es de 1500 a 12000.

11.- El complejo de conformidad con la reivindicación 9, caracterizado además porque el peso molecular promedio de dicho sulfato de dextrán es de 1800 a 6000.

12.- El complejo de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 11, caracterizado además porque la relación molecular de dicha sustancia seleccionada del grupo que consiste de OCIF, análogos del mismo y variantes del mismo: dicha sustancia seleccionada del grupo que consiste de polisacáridos y derivados de los mismos, es de 1:1 a 1:10.

13.- El complejo de conformidad con la reivindicación 12, caracterizado además porque dicha relación molecular es de 1:1 a 1:8.

14.- El complejo de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 13, caracterizado además porque la fuerza de adsorción de dicho complejo que comprende OCIF o un análogo o variante del mismo a

la heparina, es menor que la fuerza de adsorción del OCIF libre, sin combinar, o análogo o variante del mismo.

15.- El complejo de conformidad con la reivindicación 14, caracterizado además porque el grado de adsorción a la heparina, calculado de acuerdo al siguiente procedimiento, es menor de 0.7: (a) una columna empacada con perlas de agarosa entrelazadas sobre las cuales la heparina ha sido inmovilizada, es equilibrada con un regulador de pH de baja resistencia iónica que contiene cloruro de sodio de 0.1 a 0.8 M; (b) el complejo que está siendo puesto a prueba se disuelve en el mismo regulador de pH de baja resistencia iónica usado en (a) y se aplica a la columna, y se recoge entonces un primer eluato (fracción A); (c) la columna se lava entonces adicionalmente con el mismo regulador de pH de baja resistencia iónica usado en el paso (a), y se recoge un segundo eluato (fracción B); (d) la columna se lava entonces con un regulador de pH que tiene una alta resistencia iónica, conteniendo cloruro de sodio de 1.0 a 2.0 M, y se recoge entonces un tercer eluato (fracción C); (e) la cantidad del complejo presente en cada una de las fracciones A, B y C [designadas como (a), (b) y (c), respectivamente], se determina mediante un inmunoensayo; y (f) el grado de adsorción del complejo a la heparina se determina entonces de acuerdo a la siguiente fórmula:

$$\text{grado de adsorción} = \frac{(c)}{(a) + (b) + (c)}$$

16.- El complejo de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 15, caracterizado además porque comprende un OCIF o un análogo o variante del mismo y sulfato de dextrán o una sal del mismo, en donde la relación del número de moléculas de dicho OCIF o análogo o variante del mismo presente en dicho complejo, según se determina mediante prueba de inmunoabsorbente ligado a enzima (ELISA) usando anticuerpo

monoclonal OI-19 de OCIF anti-humano purificado a partir de un cultivo de un
hibridoma que produce anticuerpo OI-19 (FERM BP-6420) como el anticuerpo
unido a la fase sólida, y anticuerpo monoclonal OI-4 de OCIF anti-humano
purificado a partir de un cultivo de un hibridoma que produce anticuerpo OI-4
5 (FERM BP-6419) marcado con peroxidasa en la fase móvil: el número de
moléculas de OCIF o análogo o variante del mismo presente en dicho
complejo, según se determina midiendo el contenido total de proteína usando
el método de Lowry, es de por lo menos 0.5 a 1.2.

17.- El complejo de conformidad con la reivindicación 16,
10 caracterizado además porque dicha relación es de 0.6 a 1.1.

18.- El complejo de conformidad con la reivindicación 16,
caracterizado además porque dicha relación es de 0.7 a 1.1.

19.- El complejo de conformidad con la reivindicación 1,
caracterizado además porque dicha sustancia seleccionada del grupo que
15 consiste de OCIF, análogos del mismo y variantes del mismo es OCIF
monomérico humano que tiene un peso molecular, medido mediante SDS-
PAGE bajo condiciones no reductoras, de aproximadamente 60000, u OCIF
dimérico humano que tiene un peso molecular de aproximadamente 120000,
medido mediante SDS-PAGE bajo condiciones no reductoras, y dichos
20 polisacáridos y derivados de los mismos se seleccionan del grupo que
consiste de ácido hialurónico, ácido condroitinsulfúrico, ácido de dermatán,
ácido de heparitina, ácido de queratán, carragenina, pectina, heparina,
dextrán, y derivados de los mismos, la relación molecular de dicha sustancia
seleccionada del grupo que consiste de OCIF, análogos del mismo y variantes
25 del mismo: dicha sustancia seleccionada del grupo que consiste de
polisacáridos y derivados de los mismos, siendo de 1:1 a 1:10.

20.- El complejo de conformidad con la reivindicación 1,
caracterizado además porque dicha sustancia seleccionada del grupo que

consiste de OCIF, análogos del mismo y variantes del mismo es OCIF monomérico humano que tiene un peso molecular, medido mediante SDS-PAGE bajo condiciones no reductoras, de aproximadamente 60000, u OCIF dimérico humano que tiene un peso molecular de aproximadamente 120000, medido mediante SDS-PAGE bajo condiciones no reductoras, y dichos polisacáridos y derivados de los mismos se seleccionan del grupo que consiste de sulfato de dextrán y sales del mismo, la relación molecular de dicha sustancia seleccionada del grupo que consiste de OCIF, análogos del mismo y variantes del mismo: dicha sustancia seleccionada del grupo que consiste de polisacáridos y derivados de los mismos, siendo de 1:1 a 1:10.

21.- El complejo de conformidad con la reivindicación 1, caracterizado además porque dicha sustancia seleccionada del grupo que consiste de OCIF, análogos del mismo y variantes del mismo, es OCIF monomérico o dimérico humano en el cual dicho monómero o una de las unidades de dicho dímero de OCIF, comprende los aminoácidos +1 a + 380 de SEQ. ID. NO. 1 del listado de secuencias, y dicho derivado de polisacárido es una sal sódica de sulfato de dextrán que tiene un peso molecular promedio de 1500 a 12000, la relación molecular de dicha sustancia seleccionada del grupo que consiste de OCIF, análogos del mismo y variantes del mismo: dicha sal sódica de sulfato de dextrán, siendo de 1:1 a 1:10.

22.- El complejo de conformidad con la reivindicación 21, caracterizado además porque la relación molecular de dicha sustancia seleccionada del grupo que consiste de OCIF, análogos del mismo y variantes del mismo: dicha sal sódica de sulfato de dextrán, es de 1:1 a 1:8.

23.- El complejo de conformidad con la reivindicación 21, caracterizado además porque la relación molecular de dicha sustancia seleccionada del grupo que consiste de OCIF, análogos del mismo y variantes del mismo: dicha sal sódica de sulfato de dextrán, es de 1:1 a 1:5.

24.- El complejo de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 21 a 23, caracterizado además porque dicho derivado de polisacárido, es una sal sódica de sulfato de dextrán que tiene un peso molecular promedio de 1800 a 6000.

5 25.- Un método para prolongar el tiempo en que el OCIF o un análogo o variante del mismo es retenido en la corriente sanguínea después de su administración a un paciente, combinando antes de su administración por lo menos uno de dicho OCIF, dicho análogo del mismo o dicha variante del mismo como se define en cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, con por
10 lo menos un polisacárido o un derivado del mismo como se define en cualquiera de las reivindicaciones 1 y 7 a 11.

26.- Una composición farmacéutica que comprende una cantidad efectiva de un agente farmacológicamente activo junto con un vehículo o diluyente para el mismo, caracterizada porque dicho agente
15 farmacológicamente activo es un complejo de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 24.

27.- La composición farmacéutica de conformidad con la reivindicación 26, para el tratamiento o profilaxis de enfermedades metabólicas óseas.

20 28.- Un complejo de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 24, para su uso como medicamento.

29.- El complejo de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 24, para su uso como medicamento para la profilaxis o el tratamiento de enfermedades metabólicas óseas.

25 30.- El complejo de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 24, para su uso como medicamento para la profilaxis o el tratamiento de enfermedades metabólicas óseas seleccionadas del grupo que consiste de osteoporosis, osteopenia, enfermedad de Paget, osteomielitis,

foco infeccioso debido a pérdida de hueso, hipercalcemia, osteoclasia, destrucción de articulación u osteopenia debida a reumatismo, osteoartritis, pérdida de hueso periodontal, metástasis cancerosa de hueso, osteonecrosis o muerte de osteocitos que acompaña a lesión traumática, enfermedad de
5 Gaucher, anemia de células falciformes, lupus eritematoso sistémico o lesión no traumática, osteodistrofia, y caquexia debida a carcinoma sólido o metástasis cancerosa de hueso o enfermedad hematológica maligna.

31.- El uso de un complejo como se reclama en cualquiera de las reivindicaciones 1 a 24, en la fabricación de un medicamento para la profilaxis
10 o el tratamiento de enfermedades metabólicas óseas.

32.- El uso como se reclama en la reivindicación 31, en donde dichas enfermedades metabólicas óseas se seleccionan del grupo que consiste de osteoporosis, osteopenia, enfermedad de Paget, osteomielitis, foco infeccioso debido a pérdida de hueso, hipercalcemia, osteoclasia,
15 destrucción de articulación u osteopenia debida a reumatismo, osteoartritis, pérdida de hueso periodontal, metástasis cancerosa de hueso, osteonecrosis o muerte de osteocitos que acompaña a lesión traumática, enfermedad de Gaucher, anemia de células falciformes, lupus eritematoso sistémico o lesión no traumática, osteodistrofia, y caquexia debida a carcinoma sólido o
20 metástasis cancerosa de hueso o enfermedad hematológica maligna.

33.- Un método para la preparación de un complejo de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 24, caracterizado porque dicho método comprende los pasos de incubar por lo menos una sustancia seleccionada del grupo que consiste de OCIF, análogos del mismo
25 y variantes del mismo como se define en cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, con por lo menos una sustancia seleccionada del grupo que consiste de polisacáridos y derivados de los mismos como se define en cualquiera de las reivindicaciones 1 y 7 a 11, a un pH de 9.5 a 12, y removiendo entonces los

polisacáridos libres o derivados de los mismos que no estén unidos a dicho OCIF, análogos del mismo o variantes del mismo.

34.- El método de conformidad con la reivindicación 33, caracterizado además porque la incubación de dicha sustancia (por lo menos una) seleccionada del grupo que consiste de OCIF, análogos del mismo y variantes del mismo con dicha sustancia (por lo menos una) seleccionada del grupo que consiste de polisacáridos y derivados de los mismos, se lleva a cabo a un pH de 10 a 11.

35.- El método de conformidad con las reivindicaciones 33 ó 34, caracterizado además porque los polisacáridos libres o derivados de los mismos que no se unen a dicho OCIF, análogos del mismo o variantes del mismo después de la incubación, se remueven mediante cromatografía de filtración en gel.

36.- El complejo como se define en cualquiera de las reivindicaciones 1 a 24, caracterizado porque dicho complejo se prepara mediante un método de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 33 a 35.

70
90

RESUMEN DE LA INVENCION

Un complejo novedoso que comprende por lo menos una sustancia seleccionada del grupo que consiste de factor inhibidor de osteoclastogénesis, OCIF, análogos del mismo y variantes del mismo, el cual se une a por lo menos una sustancia seleccionada del grupo que consiste de polisacáridos y derivados de los mismos, muestra retención prolongada en la corriente sanguínea después de su administración, haciéndolo útil en el tratamiento y profilaxis de enfermedades metabólicas óseas.

10

15

20

NIT : 800176089-2

SUPERINDUSTRIA Y COMERCIO

Radicación : 82956452 00000000

Folios: 32

Fecha (AMD): 2002-06-28 17:04:21

Trámite : 002 PATENTES D 1 REGISTRO/ 411 PRESENTAC

Dependencia: 2020 DIVISION DE NUEVAS CREACIONES

RECIBO OFICIAL DE CAJA : 02 - 37,570
FECHA : JUNIO 11 DE 2002

***** CONSIGNACION *****

DEPOSITANTE	TIPO PAGO	BANCO	CUENTA	No. PAGO	FECHA PGO	Vr. PAGO
CAVELIER ABOGADOS	CONSIGNACION	BANCO POPULAR	050-00110-6	8087302	11/06/2002	45,430,000.00

***** CONCEPTO *****

CANT.	CONCEPTO	TOTAL CONCEPTO
1	0005-01-01 SOLICITUDES	
	1 TRAMITES DE SOL. DE PATENTE DE IN	378,000.00
	TOTAL :	\$ 378,000.00

SOM: TRESCIENTOS SETENTA Y OCHO MIL PESOS

RESPONSABLE : _____

RECIBO DE CAJA APLICADO AL EXPEDIENTE No. _____

010 01579-801-001-1



Industria y Comercio

SUPERINTENDENCIA

NIT : 800176089-2

SUPERINDUSTRIA Y COMERCIO

Radicacion : 02056452 00000000

Folios: 92

Fecha (AMD): 2002-06-28 17:04:11

Tramite : 002 PATENTES D 1 REGISTRO/ 411 PRESENTAR

Dependencia: 2020 DIVISION DE NUEVAS CREACIONES

***** CONSIGNACION *****

DEPOSITANTE	TIPO PAGO	BANCO	CUENTA	No. PAGO	FECHA PGO	Vr. PAGO
CAVELIER ABOGADOS	CONSIGNACION	BANCO POPULAR	050-00110-6	2894479	23/05/2002	9.928.000.00

***** CONCEPTO *****

CANT.	RENTISTICO	CONCEPTO	TOTAL CONCEPTO
1	50095-01-01	SOLICITUDES	
		82 INVOCACION DE UNA PRIORIDAD EN NU	106.000.00
		TOTAL :	106.000.00

SON: CIENTO SEIS MIL PESOS

RESPONSABLE :

RECIBO DE CAJA APLICADO AL EXPEDIENTE No.

Carrera 13 No. 27-00 Pisos 5, 7 y 10
Commutador 382 0840
Fax 350 5220
E-mail: info@sic.gov.co
www.sic.gov.co
Bogotá, D.C., Colombia

Colo 01579-001-001-1

93
93

Industria y Comercio
SUPERINTENDENCIA

REQUISITOS NECESARIOS PARA PRESENTACIÓN Y AGILIZACIÓN DEL TRAMITE

USUARIO RADICADOR

PATENTE DE INVENCION ☒

MODELO DE UTILIDAD ☒

- Indicación de que se solicita la concesión de una patente ☐ ☒
- Datos de identificación del solicitante o de la persona que presenta la solicitud ☐ ☒
- Descripción de la invención ☐ ☒
- Dibujos de ser estos pertinentes ☐ ☒
- Comprobante de Pago de las tasas establecidas ☐ ☒

COMPLETA ☒

INCOMPLETA ☐

DISEÑO INDUSTRIAL ☐

- Indicación de que se solicita el registro de Diseño Industrial. ☐ ☐
- Datos de identificación del solicitante o de la persona que presenta la solicitud. ☐ ☐
- Representación gráfica y fotográfica del Diseño Industrial o muestra del material que incorpora el diseño. ☐ ☐
- Comprobante de pago de las tasas establecidas. ☐ ☐

COMPLETA ☐

INCOMPLETA ☐

ESQUEMA DE TRAZADO ☐

- Indicación de que se solicita el registro de un Esquema de trazado. ☐ ☐
- Datos de identificación del solicitante o de la persona que presenta la solicitud. ☐ ☐
- Representación gráfica del esquema de trazado ☐ ☐
- Comprobante de pago de las tasas establecidas. ☐ ☐

COMPLETA ☐

INCOMPLETA ☐

Firma Responsable

SUPERINDUSTRIA Y COMERCIO

Radicación : 82856452 00000000

Folios: 92

Fecha (AND): 2002-06-28 17:04:11

Trámite : 002 PATENTES D 1 REGISTRO/ 411 PRESENTAC

Dependencia: 2026 DIVISION DE NUEVAS CREACIONES

Carrera 13 No. 27-00 Piso 2 mezzanina

Conmutador: 382 08 40

Fax: 350 52 20 e-mail: info@sic.gov.co

Bogotá D.C. - Colombia



2020
Bogotá, D. C.

Doctor
EMILIO FERRERO
Apoderado

Oficio No. **13481**

REFERENCIA:

Radicación	02-56452
Trámite	002
Evento	001
Actuación	430
Folios	001

Como resultado del examen de forma, realizado con fundamento en el artículo 38 de la Decisión 486 de la Comisión de la Comunidad Andina, se le comunica que:

- Allegar copia del documento en que conste la cesión del derecho a la patente otorgado por los inventores al solicitante o a su causante (art. 26-k, Dec. 486/2000).

En cumplimiento del artículo 39 de la Decisión 486, se le requiere para que dentro del término de dos (2) meses siguientes a la fecha de notificación del presente oficio, complete los requisitos anteriormente enunciados. En caso de no dar cumplimiento al presente requerimiento, la solicitud se considerará abandonada y perderá su prelación.

Notifíquese el presente oficio conforme a lo dispuesto en el numeral 5.2, literal e), del capítulo quinto del título primero de la Circular Única No. 10 de 2001.

ALIX CARMENZA CÉSPEDES DE VERGEL
Jefe de la División de Nuevas Creaciones

El anterior requerimiento fue notificado por fijación en lista de fecha 25 JUL. 2002

Se recuerda al interesado que debe presentar, dentro de los dieciséis meses siguientes contados a partir de la fecha de presentación de la solicitud cuya prioridad se invoca, copia de la misma certificada por la autoridad que la expidió y, en los casos en que haya lugar, la traducción simple del capítulo reivindicatorio. El incumplimiento de este plazo, acarreará la pérdida de la prioridad invocada.

202027

Carrera 13 No. 27-00 Pisos 5, 7 y 10
Conmutador: 382 0840
Fax: 382 2695
E-mail: info@sic.gov.co
www.sic.gov.co
Bogotá, D.C., Colombia