

X



Industria y Comercio

SUPERINTENDENCIA

Delegatura de Propiedad Industrial

División de Nuevas Creaciones

PCT

SOLICITUD

PATENTE DE INVENCION

[Handwritten signature]

05-96785

21 EXPEDIENTE No.

54 TITULO

MODIFICADORES POLIMERICOS Y COMPOSICIONES FARMACEUTICAS

51 CLASIFICACION INTERNACIONAL

A61K47/48, A61K38/16

71 SOLICITANTE

SANKYO COMPANY LIMITED

DOMICILIO

Tokio, Japón.

74 APODERADO

EMILIO FERRERO

C.C. 438.019 de Usaquén

22 BOGOTA, D C,

23/09/2005

[Handwritten initials 'JS' inside a circle]

**Industria y Comercio**

SUPERINTENDENCIA

PETITORIO

SUPERINTENDENCIA Y LICENCIAMIENTO
 Radicación: 05056785 000000000
 Fecha: 05-09-2004 17:25:13
 Remite: 011 PCT-PATENT 379 FASE NAC 411 PRESENTAL
 Dependencia: 0200 DIVISION DE NUEVAS CREACIONES

FORMULARIO UNICO DE SOLICITUD DE PATENTE**PCT****ENTRADA EN FASE NACIONAL 24-10-05****SOLICITUD DE****1**
☒ Patente de Invención
☐ Capítulo I

☐ Patente de Modelo de Utilidad
☒ Capítulo II
2**S LICITANTE (71)**
Nombre SANKYO COMPANY LIMITED
 sociedad constituida y existente bajo las leyes de JAPON

Dirección 5-1 3-chome, Nihonbashi-honcho, chuo-Ku, Tokio
 Japón

Domicilio Tokyo
 Japón
IDENTIFICACIÓN

CC	☐	NIT	☐
CE	☐	Otro	☐
		Cual	_____
Número		_____	

3**REPRESENTANTE APODERADO**
Nombre EMILIO FERRERO
Dirección Carrera 4ª No 72-35
Teléfono 347 36 11
Fax 211 86 50
E-mail clientes@camyo.com
Domicilio Bogotá, Colombia
IDENTIFICACIÓN

CC	☒	NIT	☐
CE	☐	Otro	☐
		Cual	_____
Número		<u>438 019 T P 31 929</u>	

4**INVENTOR (ES) (72)**
1 KASUYA Yuji
 c/o SANKYO COMPANY LIMITED
 2-58 Hiromachi 1-chome
 Shinagawa-Ku, Tokio 1408710
 Japón

2 HONMA Masashi
 c/o SANKYO COMPANY LIMITED
 2-58 Hiromachi 1-chome
 Shinagawa-Ku, Tokio, 1408710
 Japón
5**PCT (86)**Solicitud Internacional No PCT/JP2004/004134Fecha 24 de Marzo de 2004Publicación Internacional No WO 2004/085500 A1Fecha 7 de Octubre de 2004**6****Título (54)****MODIFICADORES POLIMÉRICOS Y COMPOSICIONES FARMACÉUTICAS****7****Clasificación Internacional (51)** C08F 218/20A61K47/48A61K38/16**8****Prioridad**SI ☒ NO ☐**(33) País de Origen**JP**(32) Fecha**
24 de Marzo de 2003
16 de Octubre de 2003
24 de Diciembre de 2003
(31) Numero de Solicitud
2003-080389
2003-355853
2003-426598
9**Comprobante de pago No** 05-69,910**Fecha** Septiembre 12 de 2005

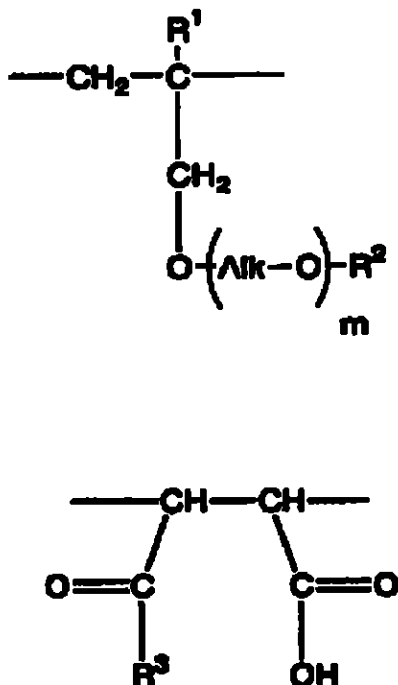
10

Anexos

- ☒ Comprobante de pago de la tasa de presentación de la solicitud por \$ 443 000 oo
- ☐ Comprobante de pago por reivindicación de prioridad
- ☒ Documento que acredita la existencia y representación legal cuando el solicitante sea persona jurídica
- ☒ Poderes, si fuere el caso
- ☐ Documento de cesión del inventor al solicitante o a su causante
- ☐ Declaraciones
- ☒ Copia de la solicitud internacional (Resumen, descripción, reivindicaciones, dibujos)
- ☒ Traducción de la solicitud internacional al castellano (Resumen, descripción, reivindicaciones, dibujos)
- ☒ Copia del examen preliminar efectuado por la IPEA
- ☐ Traducción del examen preliminar efectuado por la IPEA
- ☐ De ser el caso, copia del contrato de acceso
- ☐ De ser el caso, documento que acredite la licencia o autorización de uso de conocimientos tradicionales de las comunidades indígenas
- ☐ De ser el caso, certificado de depósito del material biológico
- ☒ Arte final 12x12
- ☐ De ser el caso, información sobre otras solicitudes de patente o títulos obtenidos en el extranjero por el mismo titular o su causante, relacionadas parcial o totalmente con la invención de esta solicitud
- ☒ Otros VER HOJA DE DOCUMENTOS ANEXOS

11

FIGURA CARACTERÍSTICA



12

Solicito la concesión de la patente,

NOMBRE

EMILIO FERRERO

FIRMA

C C 438 019 de Usaquén T P 31 929

JDF

DOCUMENTOS ANEXOS

- 1 ☒ **Publicación Internacional WO 2004/085500 A1**

Descripción

Páginas 115 en el idioma original

Páginas 176 en español

Reivindicaciones Número (s) 132

Figuras Número (s) 2

- 2 ☒ **Forma PCT/RO/101 PCT Request**
- 3 ☐ **Forma PCT/RO/106 Invitation to Correct Defects**
- 4 ☒ **Forma PCT/ISA/210 Informe de Búsqueda Internacional**
- 5 ☐ **Forma PCT/ISA/220 Notificación De La Transmisión Del Informe De Búsqueda Internacional Y De La Opinión Escrita De La Administración Encargada De La Búsqueda Internacional, O De La Declaración**
- 6 ☐ **Forma PCT/ISA/237 Opinión Escrita De La Administración Encargada De La Búsqueda Internacional**
- 7 ☐ **Forma PCT/IB/304 Notification Concerning Submission Or Transmittal Of Priority Document**
- 8 ☐ **Forma PCT/IB/306 Notification Of The Recoding Of A Change**
Descripción De Modificación
- 9 ☐ **Forma PCT/IB/308 Notice Informing The Applicant Of The Communication Of The International Application To The Designated Offices**
- 10 ☐ **Forma PCT/IB/332 Information Concerning Elected Offices Notified Of Their Election**
- 11 ☐ **FORMA PCT/IB/345 Communication in cases for which no other form is applicable**
- 12 ☐ **Forma PCT/IPEA/401 PCT Demand**
- 13 ☐ **Forma PCT/IPEA/402 Notification of Receipt Of Demand By Competent International Preliminary Examining Authority**
- 14 ☐ **Forma PCT/IPEA/408 Written Opinion**
- 15 ☐ **Forma PCT/IPEA/416 Notification Of Transmittal Of The International Preliminary Examination Report**
- 16 ☒ **Forma PCT/IPEA/409 Informe Del Examen Preliminar Internacional**
- 17 ☐ **Traducción Al Español Del Informe Del Examen Preliminar Internacional**
- 18 ☐ **Traducción Al Español De Los Anexos Presentados Junto Con El Informe Del Examen Preliminar Internacional**
- 19 ☒ **Extracto de publicación**

CAVELIER

ABOGADOS

OFICIO 8831

CARRERA 4ª N° 72-85

BOGOTÁ, S - COLOMBIA

REPRESENTACION Y PODER

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.

REPRESENTATION AND
POWER OF ATTORNEY

I (we), the undersigned / Yo (nosotros), abajo firmado (a)
SANKYO COMPANY, LIMITED

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

Nihonbashi-honcho, Chuo-ku, Tokyo, Japan, hereby ratify the appns.

Nos. 01084567; 01084568; 01084570; 01084571; 01084572; 01084574; filed by Emilio Ferrero on Oct. 3/01

por el presente nombramos a GERMAN CAVELIER, tpa. 882, GONZALO PERDOMO, tpa. 881, EMILIO FERRERO, tpa. 81929, y LUZ CLEMENCIA DE PAEZ, tpa. 23555, domiciliados en la Carrera 4ª N° 72-85, Bogotá, Colombia, en obediencia a lo dispuesto en el parágrafo 1º del Artículo 549 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 aquí. 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 suplente, en su caso, podrán ejercer la representación, en su orden, uno u otros según el caso, asumiéndola por el solo hecho de ejercerla, cuando 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, desistír, cancelar recibir, renunciar, y ratificar los actos de agentes oficiosos.

In due compliance with the terms of paragraph 1st of article 549 of the Commercial Code, do hereby appoint GERMAN CAVELIER, tpa. 882, GONZALO PERDOMO, tpa. 881, EMILIO FERRERO, tpa. 81929, and LUZ CLEMENCIA DE PAEZ, tpa. 23555; domiciled at Carrera 4ª N° 72-85, 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 cases, 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, especially 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 without a power of attorney.

Given and signed this / Dado y firmado hoy

4th day of October, 2001

In/en Tokyo, Japan

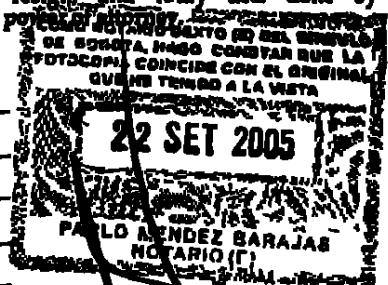
Signature

Tetsuo Takato

Firma

Representative Director and President

CAVELIER ABOGADOS
WPODERS-1 (MINUTA N° 12.1.2.5)



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 Colomb's Consul must issue a consular certificate, on (1), the legal existence of the company which grants the Power-of-Attorney, (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



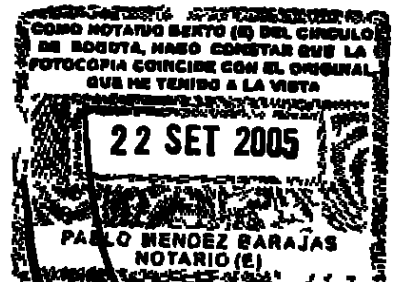
5

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



RECIBO

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

22 SET 2005

PABLO MENDEZ SARA,
NOTARIO (E)

平成 13 年 登 簿 第 1021 号

認 証

囑 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

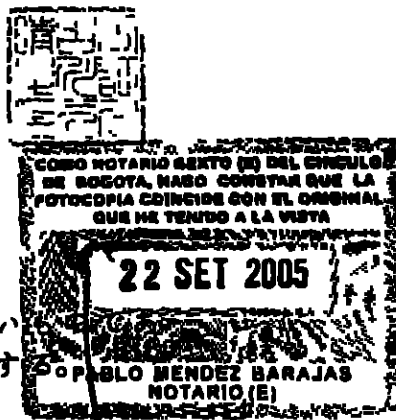
証 明

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

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

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 HOUKEN

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 503

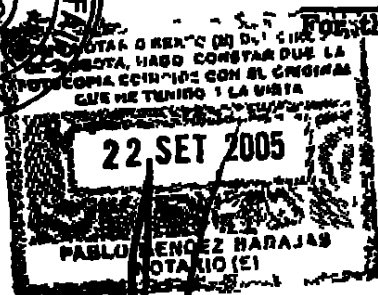
9 Seal/stamp

10 Signature

T Mochizuki

Takeshi MOCHIZUKA

For the Minister for Foreign Affairs



THE TOKYO CHAMBER OF COMMERCE AND INDUSTRY

3-2-2 MARUNOUCHI, CHIYODA-KU, TOKYO 100-0005 JAPAN PHONE 81-3-3283-7810 FAX 81-3-3201-8265

October 4, 2001

To whom it may concern

Certificate

We hereby certify that the undermentioned company was established in accordance with Japanese Commercial Law

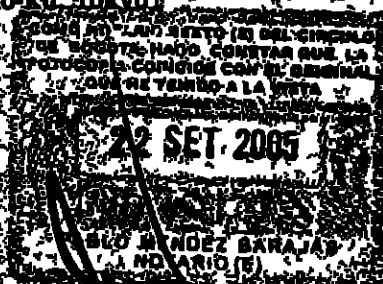
Name of the company SANKYO COMPANY, LIMITED

Registered address 5-1, Nihonbashi Honcho 3 chome, Chuo-ku, Tokyo

Date of establishment March 1, 1913

The Tokyo Chamber of Commerce and Industry


Hiroyuki Amaya
Assistant Manager



8

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

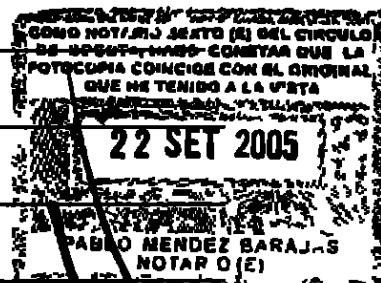
A continuación se traducen los sellos y legalizaciones de un
documento de escrito en inglés y español por medio del cual
SANKYO COMPANY, LIMITED domiciliado en el 5-1, 3-chome,
Nihonbashi-honcho, Chuo-ku, Tokio, Japón por *el presente ratifica*
las solicitudes de registro de marca Nos 01084567, 10184568,
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

Firma

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

9

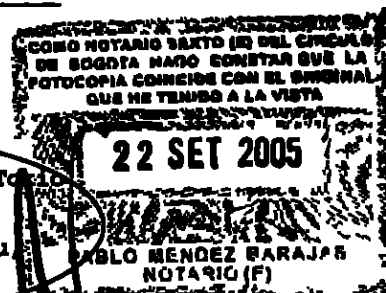
acuerdo a las Leyes de Japón, ubicada en el 5-1, 3-chome,
Nihonbashi-honcho, Chuo-ku, Tokio, Japón y quien está autorizado
a firmar el adjunto documento, ha reconocido él mismo que la
firma en el anterior documento es la suya

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

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

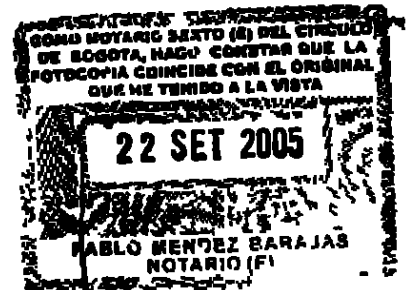
Firma Ilegible

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, debidamente 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

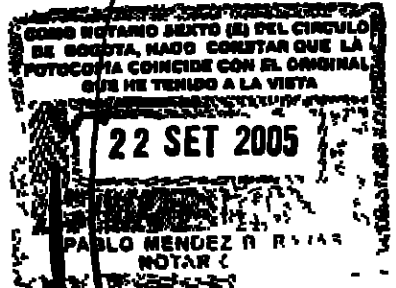
Takeshi MOCHIZUKI

Por el Ministerio de Relaciones Exteriores

Es traducción fiel y completa de la cual se deja 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



RECEIVED
2001 OCT 15 11 13 AM
MINISTERIO DE RELACIONES EXTERIORES
JAPÓN

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 SANTA FE DE BOGOTA, HAGO CONSTAR QUE LA(S) ANTERIOR(ES) FIRMA(S) PUESTA(S) POR

[Signature]

IDENTIFICADOS CON C.C. No (a)

ES SON(A) AUTENTICA(S)

SANTA FE DE BOGOTA, 12 OCT. 2001



MINISTERIO DE RELACIONES
EXTERIORES

179830

Diosdado

YAFRMA APARECE EN EL

IDENTIFICACIONES

UN FUNDAMENTO

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

22 SET 2005

PABLO MENDEZ BARAJAS

NOTARIO (E)

CAVELIER
ABOGADOS

WEB SITE www.cavellerabogados.com
E-MAIL caveller@columail.net.co

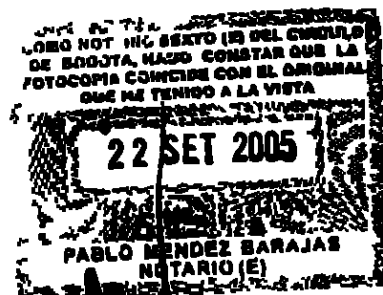
EDIFICIO SISKI
CARRERA 4 No 72 35
BOGOTÁ 8 COLOMBIA

TELEFONO (57) (1) 347 7611
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 66 del Código de Procedimiento Civil ya que los otros sustitutos faltan en este momento

Señora Jefe,


GERMÁN CAVELIER

T P A No 832

C C No 2 877 924 de Bogotá

Acepto


EMILIO FERRERO

T P A No 31 929

C C No 438 019 de Usaquén

2e-780-2

SEDO NOTARIO SE-TO (S) DEL CIRCUITO
DE BOGOTÁ, HAGO CONSTAR QUE LA
FOTOCOPIA CONCORDA CON EL ORIGINAL
QUE HE TENIDO A LA VISTA
22 SET 2005
PABLO HERNÁNDEZ BARAJAS
NOTARIO (S)

SEXTA DE BOGOTÁ

RE COPIAMIENTO Y PRESENTACIÓN PERSONAL

En la ciudad de Bogotá, D. C., a los **9** de **JUN** de **2002**

comparecieron ante mí el señor **JOSE LUIS MEDINA**

mi cliente, y el señor **JOSE LUIS MEDINA**

acompañados por

quien (as) exhibió (eron) los

2877924-428019
832-31929

y declaró (aron) que la (s) es (son) la (s) copia (s) de
en el presente documento, y que la (s) es (son) la (s) copia (s) de
que el contenido del mismo es cierto. En consecuencia,
se le otorga esta diligencia.

Jose Medina

Jose Medina



(19) World Intellectual Property
Organization
International Bureau



(43) International Publication Date
7 October 2004 (07.10.2004)

PCT

(10) International Publication Number
WO 2004/085500 A1

(51) International Patent Classification⁷ C08F 216/20,
222/06, 8/12 8/32 C08G 65/332, A61K 47/48 38/16

(74) Agents: OHNO, Akio et al c/o SANKYO COMPANY
LIMITED, 2-58 Hiromachi 1-chome, Shinagawa-ku
Tokyo, 1408710 (JP).

(21) International Application Number:
PCT/JP2004/004134

(81) Designated States (unless otherwise indicated, for every
kind of national protection available): AE, AG, AL, AM,
AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CN,
CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, EG, ES, FI,
GB, GD, GH, GI, GM, GR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE,
KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD,
MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NA, NI, NO, NZ, OM, PG,
PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SY, TJ, TM,
TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM,
ZW

(22) International Filing Date: 24 March 2004 (24.03.2004)

(25) Filing Language: English

(26) Publication Language: English

(30) Priority Data.
2003-080389 24 March 2003 (24.03.2003) JP
2003-355853 16 October 2003 (16.10.2003) JP
2003-426598 24 December 2003 (24.12.2003) JP

(84) Designated States (unless otherwise indicated, for every
kind of regional protection available): ARIPO (BW, GH,
GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW),
Bursian (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), Euro-
pean (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR,
GB, GR, HU, IE, IT, LU, MC, NL, PL, PT, RO, SE, SI, SK,
TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW,
ML, MR, NE, SN, TD, TG).

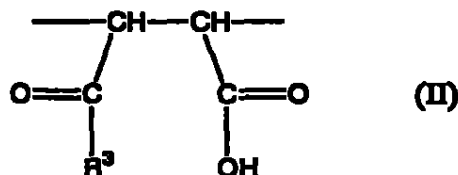
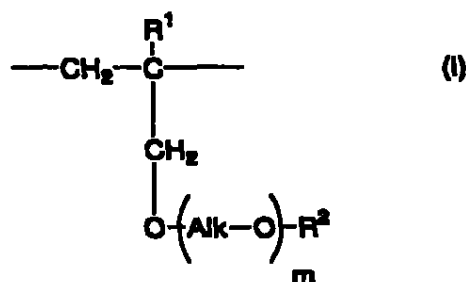
(71) Applicant (for all designated States except US): SANKYO
COMPANY LIMITED [JP/JP] 5-1, Nihonbashi Honcho
3-chome, Chuo-ku, Tokyo, 1038426 (JP).

(72) Inventors; and
(75) Inventors/Applicants (for US only): KASUYA, Yuji
[JP/JP], c/o SANKYO COMPANY, LIMITED, 2-58,
Hiromachi 1-chome, Shinagawa-ku, Tokyo, 1408710 (JP).
HONMA, Mamashi [JP/JP] c/o SANKYO COMPANY,
LIMITED, 2-58, Hiromachi 1-chome, Shinagawa-ku,
Tokyo, 1408710 (JP)

Published:
— with international search report

For two-letter codes and other abbreviations, refer to the "Guid-
ance Notes on Codes and Abbreviations" appearing at the begin-
ning of each regular issue of the PCT Gazette.

(54) Title. POLYMERIC MODIFIERS AND PHARMACEUTICAL COMPOSITIONS



(57) Abstract: A copolymer or a pharmacologically acceptable salt thereof is provided, which contains, as constitutional units, (a) one or more structural units of formula (I) wherein m is an integer of from 3 to 100, Alk represents alkylene, and R¹ and R² are the same or different and each represents hydrogen or optionally substituted alkyl, and (b) one or more structural units of formula (II): wherein R³ represents hydroxyl, optionally substituted alkoxy optionally substituted aryloxy, or a group represented by the formula -NR⁴R⁵ wherein R⁴ and R⁵ are the same or different and each represents hydrogen or optionally substituted alkyl. There is further provided a pharmaceutical composition comprising said copolymer, a protein modifier comprising said copolymer, a complex of said copolymer with a protein, a method of preventing or treating diseases using said complex, use of said complex in the manufacture of a medicament for preventing or treating diseases and methods for the synthesis of said copolymers and said complexes.

WO 2004/085500 A1

Description

Polymeric Modifiers and Pharmaceutical Compositions

5 Technical Field

The present invention relates to a novel copolymer, a pharmaceutical composition comprising said copolymer, a protein modifier comprising said copolymer, a complex of said copolymer with a protein, a method of preventing or
10 treating diseases using said complex, use of said complex in the manufacture of a medicament for preventing or treating diseases and methods for the synthesis of said copolymers and said complexes

Background of the invention

15

The modification of proteins with additional agents such as polymers has commonly been employed for the purpose of providing improved pharmaceutical properties, e.g. improved stability and retention in the blood and reduced antigenicity [for example, see F. M. Veronese and J. M. Harris, "Peptide and Protein Pegylation",
20 Advanced Drug Delivery Reviews 54(4), 2002]

When modifying proteins with a polymer, one technique employed in the past comprises binding the protein and the polymeric modifier via a covalent bond (e.g. see WO-A-97/23614). In other examples of the polymer modification of a protein,
25 such as in the modification of a drug with a polymer, the drug has been modified via a non-covalent bond. One such example is provided in Japanese Patent Application (Kokai) No. Hei 11-302199, which discloses that a graft copolymer, which comprises a graft chain of a non-ionic polymer and a main chain of a negatively-charged polymer, forms an inclusion complex with a substance capable of being positively
30 charged under physiological conditions, for example, a liposome or poly-L-lysine carrying positive charge, to improve the retention in blood. Another alternative is suggested in WO-A-99/02131 which discloses that a protein and a water-soluble polymer can be mixed under specific conditions in the presence of an organic solvent to provide controlled-release microparticles.

Unfortunately, few of these polymeric protein modifiers have been particularly successful for a variety of reasons. One recent example of a polymeric protein modifier that shows some improved properties comprises a polymaleic acid compound-based copolymer containing a polyoxyalkylene alkyl ether compound as a constituent unit [see, for example, Japanese Patent Nos. 3035675 and 3271265]. These polymeric modifiers certainly show improved binding to the target proteins. However, significant problems still exist with such copolymers. The maleic anhydride moiety thereof is found to bind to proteins non-specifically. This results in the obtained complexes of the copolymer and the protein showing non-uniform properties depending upon the conditions. Particularly, it is found that these polymeric modifiers tend to readily form disorganised cross-linked structures with the proteins thus forming bulky complexes that cause excessive modification of the protein structure and hence reduction of desired protein activity. Furthermore, complexes of these polymeric protein modifiers and a protein have been found to show unsatisfactory retention in the blood after administration.

There is, therefore, a need for a polymeric modifier capable of providing a complex having uniform properties, especially reduced production of disorganised cross-linked structures with the protein, better maintenance of protein activity and excellent retention of the protein in the blood after administration of said complex.

Brief Summary of the Invention

It is, therefore, an object of the present invention to provide a polymeric modifier capable of providing a complex having uniform properties, especially reduced production of disorganised cross-linked structures with the protein, better maintenance of protein activity and excellent retention of the protein in the blood after administration of said complex.

30

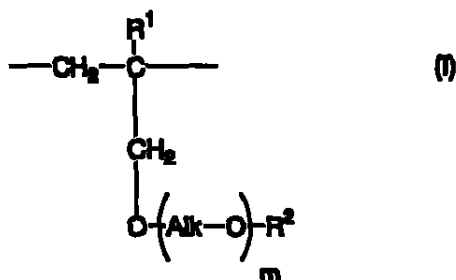
The present inventors have made an extensive study of various protein modifiers, and as a result, have succeeded in obtaining novel copolymers that are capable of forming complexes with proteins that have uniform properties, and of

markedly improving the retention in the blood of the proteins of said complexes, thus leading to the completion of the present invention.

Other objects and advantages of the present invention will become apparent as the description proceeds.

Thus, the present invention provides a copolymer or a pharmacologically acceptable salt thereof, which contains, as constitutional units,

(a) one or more structural units which may be the same or different from each other and which are represented by the formula (I) below



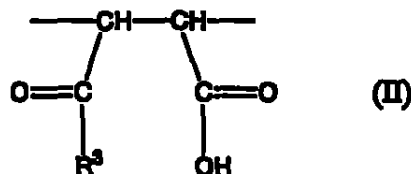
wherein

m is an integer of from 3 to 100,

Alk represents an alkylene group having from 1 to 6 carbon atoms, and

R^1 and R^2 are the same or different and each represents a hydrogen atom or an alkyl group having from 1 to 6 carbon atoms that may optionally be substituted with at least one substituent selected from the group consisting of hydroxy groups, halogen atoms and aryl groups having from 6 to 14 carbon atoms that may optionally be substituted with from 1 to 5 substituents selected from Substituents A defined below, and

(b) one or more structural units which may be the same or different from each other and which are represented by the formula (II)



wherein

R^3 represents

a hydroxyl group,

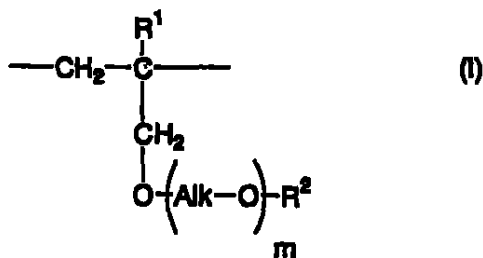
5 an alkoxy group having from 1 to 6 carbon atoms that may optionally be substituted with at least one substituent selected from the group consisting of hydroxy groups, halogen atoms and aryl groups having from 6 to 14 carbon atoms that may optionally be substituted with from 1 to 5 substituents selected from Substituents A defined below,

10 an aryloxy group having from 6 to 14 carbon atoms that may optionally be substituted with from 1 to 5 substituents selected from Substituents A defined below, or

a group represented by the formula $-NR^4R^5$, wherein R^4 and R^5 are the same or different from each other and each represents a hydrogen atom or an alkyl group having from 1 to 6 carbon atoms that may optionally be substituted with at least one substituent selected from the group consisting of hydroxy groups, halogen atoms and aryl groups having from 6 to 14 carbon atoms that may optionally be substituted with from 1 to 5 substituents selected from Substituents A defined below,

15 Substituents A are selected from alkyl groups having from 1 to 6 carbon atoms, alkoxy groups having from 1 to 6 carbon atoms, halogen atoms, hydroxy groups, nitro groups and carboxy groups.

The present invention further provides a copolymer or a pharmacologically acceptable salt thereof obtainable by subjecting one or more carboxylic anhydride moieties of formula (III) in a copolymer which contains, as constitutional units,
25 (a) one or more structural units which may be the same or different from each other and which are represented by the formula (I) below



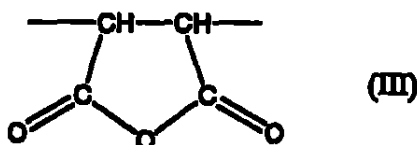
wherein

m is an integer of from 3 to 100,

Alk represents an alkylene group having from 1 to 6 carbon atoms, and

R^1 and R^2 are the same or different and each represents a hydrogen atom or an alkyl group having from 1 to 6 carbon atoms that may optionally be substituted with at least one substituent selected from the group consisting of hydroxy groups, halogen atoms and aryl groups having from 6 to 14 carbon atoms that may optionally be substituted with from 1 to 5 substituents selected from Substituents A defined below, and

(b) said one or more carboxylic anhydride moieties of formula (III)



to one or more reactions selected from the group consisting of (i) hydrolysis, (ii) ammonolysis, (iii) ammolysis and (iv) alcoholysis,

Substituents A are selected from alkyl groups having from 1 to 6 carbon atoms, alkoxy groups having from 1 to 6 carbon atoms, halogen atoms, hydroxy groups, nitro groups and carboxy groups

The present invention also provides a pharmaceutical composition comprising at least one copolymer or a pharmacologically acceptable salt thereof of the present invention as described above, particularly such a composition that also comprises at least one protein or an analogue or variant thereof

The present invention also provides a modifier capable of modifying a protein or an analogue or variant thereof, said modifier comprising a copolymer or a pharmacologically acceptable salt thereof of the present invention as described above

The present invention also provides a complex comprising at least one protein or an analogue or variant thereof which is bound to at least one copolymer or a pharmacologically acceptable salt thereof of the present invention as described above

16

The present invention also provides a pharmaceutical composition comprising an effective amount of a pharmacologically active agent together with a carrier or diluent therefor, wherein said pharmacologically active agent is a complex comprising

5 at least one protein or an analogue or variant thereof which is bound to at least one copolymer or a pharmacologically acceptable salt thereof of the present invention as described above

The present invention also provides also provides a method for prolonging

10 the time that a protein or an analogue or variant thereof is retained in the bloodstream after administration to a patient by complexing said protein or an analogue or variant thereof with at least one copolymer or a pharmacologically acceptable salt thereof of the present invention as described above.

15 The present invention also provides a method for the treatment or prophylaxis of a disease in a patient that is susceptible to a protein or an analogue or variant thereof comprising administering to said patient an effective amount of a complex comprising said protein or an analogue or variant thereof which is bound to

20 at least one copolymer or a pharmacologically acceptable salt thereof of the present invention as described above.

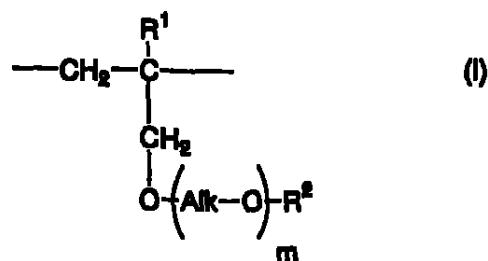
The present invention also provides the use of a complex comprising a protein or an analogue or variant thereof which is bound to at least one copolymer or a pharmacologically acceptable salt thereof of the present invention as described above

25 in the manufacture of a medicament for the prophylaxis or treatment of a disease susceptible to said protein or an analogue or variant thereof

The present invention also provides a method for the preparation of a copolymer or a pharmacologically acceptable salt thereof containing, as constitutional

30 units,

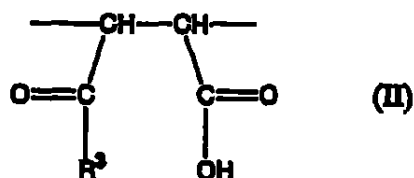
(a) one or more structural units which may be the same or different from each other and which are represented by the formula (I) below



wherein

m , Alk, R^1 and R^2 are as defined above, and

- 5 (b) one or more structural units which may be the same or different from each other and which are represented by the formula (II)

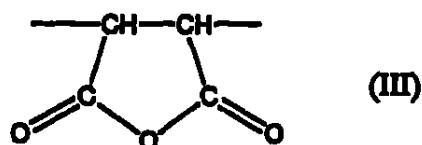


10 wherein

R^3 is as defined above,

said method comprising subjecting one or more carboxylic anhydride moieties of formula (III) in a copolymer which contains, as constitutional units,

- 15 (c) one or more structural units which may be the same or different from each other and which are represented by the formula (I) as defined above, and
 (d) said one or more carboxylic anhydride moieties of formula (III)



20

to one or more reactions selected from the group consisting of (i) hydrolysis, (ii) ammonolysis, (iii) aminolysis and (iv) alcoholysis.

The present invention also provides a method for the preparation of a complex comprising at least one protein or an analogue or variant thereof which is bound to at least one copolymer or a pharmacologically acceptable salt thereof as defined above, said method comprising reacting said copolymer or a pharmacologically acceptable salt thereof with said protein or an analogue or variant thereof under conditions favouring the formation of said complex

Brief description of the figures

Figure 1 shows results of SDS polyacrylamide gel electrophoresis on complexes of the present invention of poly(PEG₃₀₀-MA)_a-OCIF under non-reducing conditions as performed in Test Example 6 below

- (1) Molecular weight markers
- (2) Complex of poly(PEG₃₀₀-MA)_a-Na (Compound No 9)-OCIF [OCIF polymeric modifier=1.1 (weight ratio)]
- (3) Complex of poly(PEG₃₀₀-MA)_a-Na (Compound No 9)-OCIF [OCIF polymeric modifier=1.2 (weight ratio)]
- (4) Complex of poly(PEG₃₀₀-MA)_a-Na (Compound No 9)-OCIF [OCIF polymeric modifier=1.3 (weight ratio)]
- (5) Complex of poly(PEG₃₀₀-MA)_a-Na (Compound No 9)-OCIF [OCIF polymeric modifier=1.4 (weight ratio)]
- (6) Complex of poly(PEG₃₀₀-MA)_a-Na (Compound No 9)-OCIF [OCIF polymeric modifier=1.5 (weight ratio)]
- (7) Non-modified OCIF

Figure 2 shows further results of SDS polyacrylamide gel electrophoresis on complexes of the present invention of poly(PEG₃₀₀-MA)_a-OCIF under non-reducing conditions as performed in Test Example 6 below

- (1) Molecular weight marker
- (2) Complex of poly(PEG₃₀₀-MA)_a-Na (Compound No 9)-OCIF [OCIF polymeric modifier=1.1 (weight ratio), OCIF concentration during incubation 3.5 mg/ml]
- (3) Complex of poly(PEG₃₀₀-MA)_a-Na (Compound No 9)-OCIF [OCIF polymeric modifier=1.1 (weight ratio), OCIF concentration during incubation 1.75 mg/ml]

- (4) Complex of poly(PEG₅₀₀-MA)-a-Na (Compound No. 9)-OCIF [OCIF polymeric modifier=1.1 (weight ratio), OCIF concentration during incubation 0.875 mg/ml]
 (5) Complex of poly(PEG₅₀₀-MA)-a-Na (Compound No. 9)-OCIF [OCIF polymeric modifier=1.2 (weight ratio), OCIF concentration during incubation 1.75 mg/ml]
 5 (6) Complex of poly(PEG₅₀₀-MA)-a-Na (Compound No. 9)-OCIF [OCIF polymeric modifier=1.4 (weight ratio), OCIF concentration during incubation 0.875 mg/ml]
 (7) Non-modified OCIF

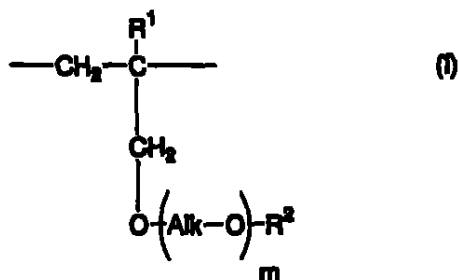
Figure 3 shows the results of SDS polyacrylamide gel electrophoresis of prior art complexes of poly(PEG₅₀₀-MA)-OCIF under non-reducing conditions as performed in Test Example 6 below

- (1) Molecular weight marker
 (2) Complex of poly(PEG₅₀₀-MA) (AM-0530K)-OCIF [OCIF polymeric modifier=1.10 (weight ratio)]
 15 (3) Complex of poly(PEG₅₀₀-MA) (AM-0530K)-OCIF [OCIF polymeric modifier=1.2.5 (weight ratio)]
 (4) Complex of poly(PEG₅₀₀-MA) (AM-0530K)-OCIF [OCIF polymeric modifier=1.1 (weight ratio)]
 (10) Non-modified OCIF

20

Detailed Description of the Invention

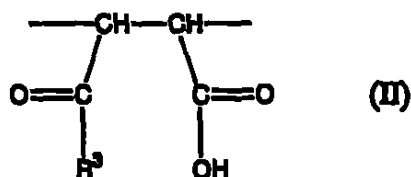
- (1) As noted above, one aspect of the present invention provides a copolymer or a pharmacologically acceptable salt thereof, which contains, as constitutional units,
 25 (a) one or more structural units which may be the same or different from each other and which are represented by the formula (I) below



wherein

m, Alk, R¹ and R² are as defined above, and

(b) one or more structural units which may be the same or different from each other and which are represented by the formula (II)



wherein R³ is as defined above. Of these copolymers and pharmacologically acceptable salts thereof, preferred ones include

10

(2) a copolymer or a pharmacologically acceptable salt thereof according to (1), wherein the structural units represented by the formula (I) and the structural units represented by the formula (II) are arranged in an alternating head-to-head sequence, an alternating head-to-tail sequence or an alternating mixed sequence of head-to-head and head-to-tail,

15

(3) a copolymer or a pharmacologically acceptable salt thereof according to (1), wherein the structural units represented by the formula (I) and the structural units represented by the formula (II) are arranged in a random sequence,

20

(4) a copolymer or a pharmacologically acceptable salt thereof according to any one of (1) to (3), wherein Alk is an ethylene or trimethylene group,

25

(5) a copolymer or a pharmacologically acceptable salt thereof according to (4), wherein Alk is an ethylene group,

(6) a copolymer or a pharmacologically acceptable salt thereof according to any one of (1) to (5), wherein m is an integer of from 3 to 50;

30

(7) a copolymer or a pharmacologically acceptable salt thereof according to (6), wherein m is an integer of from 3 to 40,

(8) a copolymer or a pharmacologically acceptable salt thereof according to (7), wherein m is an integer of from 6 to 16 or 28 to 38,

5 (9) a copolymer or a pharmacologically acceptable salt thereof according to (8), wherein m is an integer of from 6 to 16,

(10) a copolymer or a pharmacologically acceptable salt thereof according to any one of (1) to (9), wherein R^1 is a hydrogen atom or a methyl group,

10

(11) a copolymer or a pharmacologically acceptable salt thereof according to (10), wherein R^1 is a hydrogen atom,

15 (12) a copolymer or a pharmacologically acceptable salt thereof according to any one of (1) to (11), wherein R^2 is a hydrogen atom or a methyl group,

(13) a copolymer or a pharmacologically acceptable salt thereof according to (12), wherein R^2 is a methyl group;

20 (14) a copolymer or a pharmacologically acceptable salt thereof according to any one of (1) to (13), wherein R^3 is a hydroxyl group, an alkoxy group having from 1 to 6 carbon atoms or a group represented by the formula $-NR^4R^5$, wherein R^4 and R^5 are the same or different and each represents a hydrogen atom or an alkyl group having from 1 to 6 carbon atoms,

25

(15) a copolymer or a pharmacologically acceptable salt thereof according to (14), wherein R^3 is a hydroxyl group or an alkoxy group having from 1 to 6 carbon atoms,

30 (16) a copolymer or a pharmacologically acceptable salt thereof according to (15), comprising at least one structural unit represented by the formula (II) in which R^3 is an alkoxy group having from 1 to 6 carbon atoms and optionally at least one structural unit represented by the formula (II) in which R^3 is a hydroxyl group, wherein the ratio between the structural units represented by the formula (II) in which R^3 is a hydroxy

group and the structural units represented by the formula (II) in which R^3 is an alkoxy group having from 1 to 6 carbon atoms is in the range of from 4.6 to 0.10,

5 (17) a copolymer or a pharmacologically acceptable salt thereof according to (15) or (16), wherein R^3 is an alkoxy group having from 1 to 6 carbon atoms,

(18) a copolymer or a pharmacologically acceptable salt thereof according to any one of (15) to (17), wherein said alkoxy group having from 1 to 6 carbon atoms is an ethoxy group,

10

(19) a copolymer or a pharmacologically acceptable salt thereof according to (14), wherein R^3 is a hydroxyl group or a group represented by the formula $-NR^4R^5$, wherein R^4 and R^5 are the same or different and each represents a hydrogen atom or an alkyl group having from 1 to 6 carbon atoms,

15

(20) a copolymer or a pharmacologically acceptable salt thereof according to (19), comprising at least one structural unit represented by the formula (II) in which R^3 is a group represented by the formula $-NR^4R^5$, wherein R^4 and R^5 are the same or different and each represents a hydrogen atom or an alkyl group having from 1 to 6 carbon atoms and optionally at least one structural unit represented by the formula (II) in which P^3 is a hydroxyl group, wherein the ratio between the structural units represented by the formula (II) in which R^3 is a hydroxy group and the structural units represented by the formula (II) in which R^3 is a group represented by the formula $-NR^4R^5$ is in the range of from 5.5 to 0.10;

25

(21) a copolymer or a pharmacologically acceptable salt thereof according to (20), wherein the ratio between the structural units represented by the formula (II) in which R^3 is a hydroxy group and the structural units represented by the formula (II) in which R^3 is a group represented by the formula $-NR^4R^5$ is in the range of from 4.6 to 0.10,

30

(22) a copolymer or a pharmacologically acceptable salt thereof according to any one of (19) to (21), wherein R^3 is a group represented by the formula $-NR^4R^5$, wherein R^4 and R^5 are the same or different and each represents a hydrogen atom or an alkyl group having from 1 to 6 carbon atoms,

- (23) a copolymer or a pharmacologically acceptable salt thereof according to any one of (19) to (22), wherein the group represented by the formula $-NR^4R^5$ is an amino group, a methylamino group or a dimethylamino group,
- 5
- (24) a copolymer or a pharmacologically acceptable salt thereof according to (23), wherein the group represented by the formula $-NR^4R^5$ is an amino group,
- (25) a copolymer or a pharmacologically acceptable salt thereof according to (23),
- 10 wherein the group represented by the formula $-NR^4R^5$ is a dimethylamino group,
- (26) a copolymer or a pharmacologically acceptable salt thereof according to (14), wherein R^3 is a hydroxyl group,
- 15
- (27) a copolymer or a pharmacologically acceptable salt thereof according to (14), wherein R^3 is a 1-amino-2-propanol group,
- (28) a copolymer or a pharmacologically acceptable salt thereof according to any one of (1) to (27), wherein the ratio between the structural unit represented by the
- 20 formula (I) and the structural unit represented by the formula (II) is in the range of from 10/1 to 1/10,
- (29) a copolymer or a pharmacologically acceptable salt thereof according to (28), wherein the ratio between the structural unit represented by the formula (I) and the
- 25 structural unit represented by the formula (II) is in the range of from 3/1 to 1/8,
- (30) a copolymer or a pharmacologically acceptable salt thereof according to (28), wherein the ratio between the structural unit represented by the formula (I) and the
- 30 structural unit represented by the formula (II) is in the range of from 2/1 to 1/2 or 1/2 to 1/6,
- (31) a copolymer or a pharmacologically acceptable salt thereof according to (28), wherein the ratio between the structural unit represented by the formula (I) and the structural unit represented by the formula (II) is 1/1 or in the range of from 1/2 to 1/4,

20

- (32) a copolymer or a pharmacologically acceptable salt thereof according to any one of (1) to (31), wherein the average degree of polymerization is in the range of from 5 to 200;
- 5 (33) a copolymer or a pharmacologically acceptable salt thereof according to (32), wherein the average degree of polymerization is in the range of from 5 to 50,
- (34) a copolymer or a pharmacologically acceptable salt thereof according to (33),
10 wherein the average degree of polymerization is in the range of from 5 to 20,
- (35) a copolymer or a pharmacologically acceptable salt thereof according to (32), wherein the average degree of polymerization is in the range of from 20 to 30,
- 15 (36) a copolymer or a pharmacologically acceptable salt thereof according to (32), wherein the average degree of polymerization is in the range of from 30 to 40,
- (37) a copolymer or a pharmacologically acceptable salt thereof according to any one of (1) to (31), wherein the Stokes radius thereof is 9.3 nm or less,
20 (38) a copolymer or a pharmacologically acceptable salt thereof according to (37), wherein the Stokes radius thereof is 7.3 nm or less,
- (39) a copolymer or a pharmacologically acceptable salt thereof according to (38),
25 wherein the Stokes radius thereof is 6.2 nm or less,
- (40) a copolymer or a pharmacologically acceptable salt thereof according to (39), wherein the Stokes radius thereof is 4.7 nm or less,
- 30 (41) a copolymer or a pharmacologically acceptable salt thereof according to (40), wherein the Stokes radius thereof is 3.1 nm or less,
- (42) a copolymer or a pharmacologically acceptable salt thereof according to (37), wherein the Stokes radius thereof is in the range of from 1.5 nm to 4.7 nm,
-

(43) a copolymer or a pharmacologically acceptable salt thereof according to (37), wherein the Stokes radius thereof is in the range of from 3.1 nm to 6.2 nm, and

5 (44) a copolymer according or a pharmacologically acceptable salt thereof according to (1) wherein,

m is an integer of from 3 to 100,

Alk represents an alkylene group having from 1 to 6 carbon atoms,

10 R^1 and R^2 are the same or different and each represents a hydrogen atom or an alkyl group having from 1 to 6 carbon atoms, and

R^3 represents a hydroxyl group, an alkoxy group having from 1 to 6 carbon atoms that may optionally be substituted with one hydroxy group, or a group represented by the formula $-NR^4R^5$, wherein R^4 and R^5 are the same or different from each other and each represents a hydrogen atom or an alkyl group having from 1 to 6 carbon atoms that may optionally be substituted with one hydroxy group.

(45) a copolymer or a pharmacologically acceptable salt thereof according to (1), wherein Alk represents an ethylene group, R^1 represents a hydrogen atom, R^2 represents a methyl group and m, R^3 , the ratio of the structural units of formulae (I) and (II) (the composition ratio) and, where relevant, the ratio between the units of formula (II) wherein R^3 represents a hydroxy group and the units of formula (II) wherein R^3 represents a group other than hydroxy (the hydrolysis ratio) are selected from the following.

25 (i) m is from 6 to 16, R^3 is a hydroxy group, the composition ratio is 1:1 and the average degree of polymerisation is from 30 to 40,

(ii) m is from 28 to 38, R^3 is a hydroxy group, the composition ratio is 1:1 and the average degree of polymerisation is from 10 to 15,

30 (iii) m is from 6 to 16, R^3 is an amino group, the composition ratio is 1:1 and the average degree of polymerisation is from 30 to 40,

(iv) m is from 6 to 16, R^3 is a dimethylamino group, the composition ratio is 1:1 and the average degree of polymerisation is from 30 to 40;

(v) m is from 6 to 16, R^3 is a 1-amino-2-propanol group, the composition ratio is 1:1 and the average degree of polymerisation is from 30 to 40,

21

- (vi) m is from 6 to 16, R³ is selected from ethoxy and hydroxy groups, the composition ratio is 1:1, the average degree of polymerisation is from 30 to 40 and the hydrolysis ratio is 4:6,
- 5 (vii) m is from 28 to 16, R³ is selected from amino and hydroxy groups, the composition ratio is 1:1, the average degree of polymerisation is from 10 to 15 and the hydrolysis ratio is 4:6,
- (viii) m is from 28 to 38, R³ is a dimethylamino group, the composition ratio is 1:1 and the average degree of polymerisation is from 10 to 15,
- 10 (ix) m is from 6 to 16, R³ is selected from amino and hydroxy groups, the composition ratio is 1:1, the average degree of polymerisation is from 30 to 40, the hydrolysis ratio is 3:1:6:9 and the copolymer is a sodium salt,
- (x) m is from 6 to 16, R³ is selected from amino and hydroxy groups, the composition ratio is 1:1, the average degree of polymerisation is from 30 to 40 and the hydrolysis ratio is 1:4:8:6,
- 15 (xi) m is from 6 to 16, R³ is selected from dimethylamino and hydroxy groups, the composition ratio is 1:1, the average degree of polymerisation is from 30 to 40, the hydrolysis ratio is 2.9:7:1 and the copolymer is a sodium salt;
- (xii) m is from 6 to 16, R³ is an amino group, the composition ratio is 1:2.4 and the average degree of polymerisation is from 20 to 30;
- 20 (xiii) m is from 6 to 16, R³ is selected from amino and hydroxy groups, the composition ratio is 1:2:4, the average degree of polymerisation is from 20 to 30 and the hydrolysis ratio is 0:4:9:6,
- (xiv) m is from 6 to 16, R³ is selected from amino and hydroxy groups, the composition ratio is 1:2:4, the average degree of polymerisation is from 20 to 30 and the hydrolysis ratio is 2.9:7:1,
- 25 (xv) m is from 6 to 16, R³ is selected from amino and hydroxy groups, the composition ratio is 1:2:4, the average degree of polymerisation is from 20 to 30 and the hydrolysis ratio is 0:9:9:1,
- (xvi) m is from 6 to 16, R³ is selected from amino and hydroxy groups, the composition ratio is 1:2:4, the average degree of polymerisation is from 20 to 30 and the hydrolysis ratio is 0.5:9.5,
- 30 (xvii) m is from 6 to 16, R³ is selected from amino and hydroxy groups, the composition ratio is 1:2.4, the average degree of polymerisation is from 20 to 30 and the hydrolysis ratio is 1:3:8:7,

- (xviii) m is from 6 to 16, R^3 is selected from amino and hydroxy groups, the composition ratio is 1.2.4, the average degree of polymerisation is from 20 to 30 and the hydrolysis ratio is 1.9.8.1,
- (xix) m is from 6 to 16, R^3 is selected from amino and hydroxy groups, the composition ratio is 1.2.4, the average degree of polymerisation is from 20 to 30 and the hydrolysis ratio is 1.0.9.0,
- (xx) m is from 6 to 16, R^3 is selected from amino and hydroxy groups, the composition ratio is 1.2.4, the average degree of polymerisation is from 20 to 30 and the hydrolysis ratio is 0.8.9.2,
- (xxi) m is from 6 to 16, R^3 is selected from amino and hydroxy groups, the composition ratio is 1.2.4, the average degree of polymerisation is from 20 to 30 and the hydrolysis ratio is 4.6.5.4,
- (xxii) m is from 6 to 16, R^3 is selected from amino and hydroxy groups, the composition ratio is 1.2.4, the average degree of polymerisation is from 20 to 30 and the hydrolysis ratio is 1.2.8.8,
- (xxiii) m is from 6 to 16, R^3 is selected from amino and hydroxy groups, the composition ratio is 1.2.4, the average degree of polymerisation is from 20 to 30 and the hydrolysis ratio is 2.0.8.0,
- (xxiv) m is from 6 to 16, R^3 is selected from amino and hydroxy groups, the composition ratio is 1.2.4, the average degree of polymerisation is from 20 to 30 and the hydrolysis ratio is 1.1.8.9,
- (xxv) m is from 6 to 16, R^3 is selected from amino and hydroxy groups, the composition ratio is 1.2.4, the average degree of polymerisation is from 20 to 30 and the hydrolysis ratio is 2.4.7.6,
- (xxvi) m is from 6 to 16, R^3 is selected from amino and hydroxy groups, the composition ratio is 1.2.4, the average degree of polymerisation is from 20 to 30 and the hydrolysis ratio is 0.9.9.1,
- (xxvii) m is from 6 to 16, R^3 is selected from amino and hydroxy groups, the composition ratio is 1.2.4, the average degree of polymerisation is from 20 to 30 and the hydrolysis ratio is 1.5.8.5,
- (xxviii) m is from 6 to 16, R^3 is selected from amino and hydroxy groups, the composition ratio is 1.2.4, the average degree of polymerisation is from 20 to 30 and the hydrolysis ratio is 0.7.9.3,

- (xxix) m is from 6 to 16, R^3 is selected from amino and hydroxy groups, the composition ratio is 1 2.4, the average degree of polymerisation is from 20 to 30 and the hydrolysis ratio is 4.5 5.5,
- 5 (xxx) m is from 6 to 16, R^3 is selected from amino and hydroxy groups, the composition ratio is 1 2.4, the average degree of polymerisation is from 20 to 30 and the hydrolysis ratio is 1 4 8 6,
- (xxxi) m is from 6 to 16, R^3 is selected from amino and hydroxy groups, the composition ratio is 1 2.4, the average degree of polymerisation is from 20 to 30 and the hydrolysis ratio is 0 7-9.3,
- 10 (xxxii) m is from 6 to 16, R^3 is selected from amino and hydroxy groups, the composition ratio is 1 2 4, the average degree of polymerisation is from 20 to 30 and the hydrolysis ratio is 0 8 9 2,
- (xxxiii) m is from 6 to 16, R^3 is selected from amino and hydroxy groups, the composition ratio is 1 2.4, the average degree of polymerisation is from 20 to 30 and the hydrolysis ratio is 1 4 8 6,
- 15 (xxxiv) m is from 6 to 16, R^3 is selected from amino and hydroxy groups, the composition ratio is 1.3 1, the average degree of polymerisation is from 20 to 30 and the hydrolysis ratio is 0 7-9.3,
- (xxxv) m is from 6 to 16, R^3 is selected from amino and hydroxy groups, the composition ratio is 1 2.4, the average degree of polymerisation is from 20 to 30 and the hydrolysis ratio is 0 9 9 1,
- 20 (xxxvi) m is from 6 to 16, R^3 is selected from amino and hydroxy groups, the composition ratio is 1 2 4, the average degree of polymerisation is from 20 to 30 and the hydrolysis ratio is 1 9 8 1,
- 25 (xxxvii) m is from 6 to 16, R^3 is selected from ethoxy and hydroxy groups, the composition ratio is about 1 3, the average degree of polymerisation is from 20 to 30 and the hydrolysis ratio is 3 1 6 9;
- (xxxviii) m is from 6 to 16, R^3 is selected from amino and hydroxy groups, the composition ratio is 1 1, the hydrolysis ratio is 1 4 8 6 and the Stokes radius is 9 3 nm or less,
- 30 (xxxix) m is from 6 to 16, R^3 is selected from amino and hydroxy groups, the composition ratio is 1 1, the hydrolysis ratio is 1 4 8 6 and the Stokes radius is in the range of from 3 1 to 6 2 nm,

(xl) m is from 6 to 16, R^3 is selected from amino and hydroxy groups, the composition ratio is 1:1, the hydrolysis ratio is 1:4:8:6 and the Stokes radius is in the range of from 1.5 to 4.7 nm,

(xli) m is from 6 to 16, R^3 is selected from amino and hydroxy groups, the composition ratio is 1:1, the hydrolysis ratio is 1:4:8:6 and the Stokes radius is 3.1 nm or less;

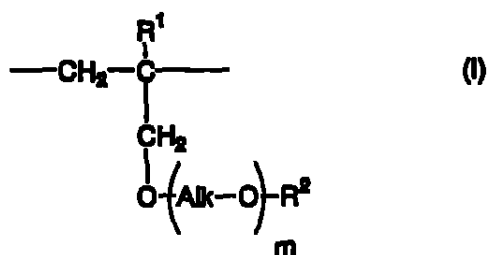
(xlii) m is from 6 to 16, R^3 is selected from amino and hydroxy groups, the composition ratio is 1:1, the hydrolysis ratio is 1:4:8:6 and the Stokes radius is 7.8 nm or less,

(xliii) m is from 6 to 16, R^3 is selected from amino and hydroxy groups, the composition ratio is 1:1, the hydrolysis ratio is 1:4:8:6 and the Stokes radius is 6.2 nm or less, and

(xliv) m is from 6 to 16, R^3 is selected from amino and hydroxy groups, the composition ratio is 1:1, the hydrolysis ratio is 1:4:8:6 and the Stokes radius is 4.7 nm or less.

(46) As noted above, another aspect of the present invention provides a copolymer or a pharmacologically acceptable salt thereof obtainable by subjecting one or more carboxylic anhydride moieties of formula (III) in a copolymer which contains, as constitutional units,

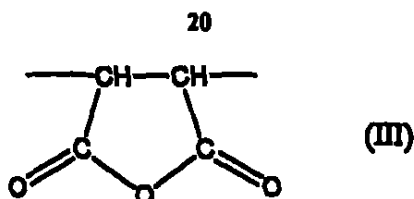
(a) one or more structural units which may be the same or different from each other and which are represented by the formula (I) below



wherein

m , Alk, R^1 and R^2 are as defined above, and

(b) said structural unit comprising a carboxylic anhydride moiety of formula (III)



to one or more reactions selected from the group consisting of (i) hydrolysis, (ii) ammonolysis, (iii) aminolysis and (iv) alcoholysis

5

Of these copolymers and pharmacologically acceptable salts thereof, preferred ones are

- 10 (47) a copolymer or a pharmacologically acceptable salt thereof according to (46), wherein the structural unit represented by the formula (I) and the structural unit represented by the formula (III) in the copolymer are arranged in an alternating head-to-head sequence, an alternating head-to-tail sequence or an alternating mixed sequence of head-to-head and head-to-tail,
- 15 (48) a copolymer or a pharmacologically acceptable salt thereof according to according to (46), wherein the structural unit represented by the formula (I) and the structural unit represented by the formula (III) in the copolymer are arranged in random sequence,
- 20 (49) a copolymer or a pharmacologically acceptable salt thereof according to any one of (46) to (48), wherein Alk is an ethylene or trimethylene group,
- (50) a copolymer or a pharmacologically acceptable salt thereof according to according to (49), wherein Alk is an ethylene group,
- 25 (51) a copolymer or a pharmacologically acceptable salt thereof according to any one of (46) to (50), wherein m is an integer of from 3 to 50,
- (52) a copolymer or a pharmacologically acceptable salt thereof according to (51),
- 30 wherein m is an integer of from 3 to 40,

(53) a copolymer or a pharmacologically acceptable salt thereof according to (52), wherein m is an integer of from 6 to 16 or 28 to 38,

(54) a copolymer or a pharmacologically acceptable salt thereof according to (53), wherein m is an integer of from 6 to 16,

(55) a copolymer or a pharmacologically acceptable salt thereof according to any one of (46) to (54), wherein R^1 is a hydrogen atom or a methyl group,

(56) a copolymer or a pharmacologically acceptable salt thereof according to (55), wherein R^1 is a hydrogen atom,

(57) a copolymer or a pharmacologically acceptable salt thereof according to any one of (46) to (56), wherein R^2 is a hydrogen atom or a methyl group,

(58) a copolymer or a pharmacologically acceptable salt thereof according to (57), wherein R^2 is a methyl group,

(59) a copolymer or a pharmacologically acceptable salt thereof according to any one of (46) to (58), wherein the ratio between the structural unit represented by the formula (I) and the structural unit obtained by subjecting one or more structural units of formula (III) to one or more reactions selected from the group consisting of (i) hydrolysis, (ii) ammonolysis, (iii) aminolysis and (iv) alcoholysis is in the range of from 10¹ to 10⁻¹;

(60) a copolymer or a pharmacologically acceptable salt thereof according to (59), wherein the ratio between the structural unit represented by the formula (I) and the structural unit obtained by subjecting one or more structural units of formula (III) to one or more reactions selected from the group consisting of (i) hydrolysis, (ii) ammonolysis, (iii) aminolysis and (iv) alcoholysis is in the range of from 3¹ to 8⁻¹,

(61) a copolymer or a pharmacologically acceptable salt thereof according to (59), wherein the ratio between the structural unit represented by the formula (I) and the structural unit obtained by subjecting one or more structural units of formula (III) to

one or more reactions selected from the group consisting of (i) hydrolysis, (ii) ammonolysis, (iii) aminolysis and (iv) alcoholysis is in the range of from 2.1 to 1.2 or 1.2 to 1.6,

5 (62) a copolymer or a pharmacologically acceptable salt thereof according to (59), wherein the ratio between the structural unit represented by the formula (I) and the structural unit obtained by subjecting one or more structural units of formula (III) to one or more reactions selected from the group consisting of (i) hydrolysis, (ii) ammonolysis, (iii) aminolysis and (iv) alcoholysis is 1.1 or in the range of from 1.2 to
10 1.4,

(63) a copolymer or a pharmacologically acceptable salt thereof according to any one of (46) to (62), wherein the average degree of polymerization is in the range of from 5 to 200,
15

(64) a copolymer or a pharmacologically acceptable salt thereof according to (63), wherein the average degree of polymerization is in the range of from 5 to 50,

(65) a copolymer or a pharmacologically acceptable salt thereof according to (64),
20 wherein the average degree of polymerization is in the range of from 5 to 20,

(66) a copolymer or a pharmacologically acceptable salt thereof according to (63), wherein the average degree of polymerization is in the range of from 20 to 30,

25 (67) a copolymer or a pharmacologically acceptable salt thereof according to (63), wherein the average degree of polymerization is in the range of from 30 to 40,

(68) a copolymer according or a pharmacologically acceptable salt thereof according to (46) wherein
30 m is an integer of from 3 to 100,
Alk represents an alkylene group having from 1 to 6 carbon atoms, and
R¹ and R² are the same or different and each represents a hydrogen atom or an alkyl group having from 1 to 6 carbon atoms,

(69) a copolymer or a pharmacologically acceptable salt thereof according to any one of (46) to (68), which is obtainable by subjecting a carboxylic anhydride moiety of formula (III) in the copolymer to ammonolysis,

5 (70) a copolymer or a pharmacologically acceptable salt thereof according to (69), which is obtainable by carrying out the ammonolysis with ammonia water;

(71) a copolymer or a pharmacologically acceptable salt thereof according to any one of (46) to (68), which is obtainable by subjecting a carboxylic anhydride moiety
10 of formula (III) in the copolymer to aminolysis,

(72) a copolymer or a pharmacologically acceptable salt thereof according to (71), which is obtainable by carrying out the aminolysis using an aqueous dimethylamine solution,
15

(73) a copolymer or a pharmacologically acceptable salt thereof according to any one of (46) to (68), which is obtainable by subjecting a carboxylic anhydride moiety of formula (III) in the copolymer to alcoholysis, and

20 (74) a copolymer or a pharmacologically acceptable salt thereof according to (73), which is obtainable by carrying out the alcoholysis using ethanol

The present invention also makes use of the copolymers and pharmacologically acceptable salts thereof of the present invention to provide a
25 pharmaceutical composition, a modifier capable of modifying a protein, a complex, a method for prolonging the time that a protein is retained in the bloodstream, a method for the treatment or prophylaxis of diseases and a use of the complex of the invention for the manufacture of a medicament for the treatment or prophylaxis of diseases
Preferred examples of aspects of these inventions include

30

(75) a pharmaceutical composition comprising a pharmaceutically acceptable diluent or carrier and at least one copolymer or a pharmacologically acceptable salt thereof of the present invention according to any one of (1) to (74),

(76) a pharmaceutical composition according to (75), wherein said composition further comprises at least one protein or an analogue or variant thereof;

5 (77) a pharmaceutical composition according to (76), wherein the protein or an analogue or variant thereof is a basic protein,

(78) a pharmaceutical composition according to (77), wherein the basic protein is a basic fibroblast growth factor (bFGF), an epidermal growth factor (EGF), an osteoclastogenesis inhibitory factor (OCIF), a platelet-derived growth factor (PDGF),
10 a brain-derived neurotrophic factor (BDNF), a nerve growth factor (NGF), a human growth hormone (HGH), a hepatocyte growth factor (HGF), or a vascular endothelial growth factor (VEGF), or an analogue or a variant thereof,

15 (79) a pharmaceutical composition according to (77), wherein the basic protein is an osteoclastogenesis inhibitory factor (OCIF) or an analogue or a variant thereof;

(80) a pharmaceutical composition according to (79), wherein said OCIF or an analogue or variant thereof is natural type or recombinant type OCIF;

20 (81) a pharmaceutical composition according to (79), wherein said OCIF or an analogue or variant thereof is a monomer or a dimer;

(82) a pharmaceutical composition according to (79), wherein said OCIF is a monomer of human OCIF having a molecular weight as measured by SDS-PAGE
25 under non-reducing conditions of about 60000 or a dimer of human OCIF having a molecular weight of about 120000 as measured by SDS-PAGE under non-reducing conditions,

30 (83) a pharmaceutical composition according to (79), wherein said OCIF comprises amino acids -21 to +380 of SEQ ID NO 1 of the sequence listing,

(84) a pharmaceutical composition according to (79), wherein said OCIF comprises amino acids +1 to +380 of SEQ ID NO 1 of the sequence listing,

(85) a modifier capable of modifying a protein or an analogue or variant thereof, said modifier comprising the copolymer or a pharmacologically acceptable salt thereof according to any one of (1) to (74),

5 (86) a modifier capable of modifying a protein or an analogue or variant thereof according to (85), wherein the protein is a basic protein,

(87) a modifier capable of modifying a protein or an analogue or variant thereof according to (86), wherein the basic protein is a basic fibroblast growth factor (bFGF),
10 an epidermal growth factor (EGF), an osteoclastogenesis inhibitory factor (OCIF), a platelet-derived growth factor (PDGF), a brain-derived neurotrophic factor (BDNF), a nerve growth factor (NGF), a human growth hormone (HGH), a hepatocyte growth factor (HGF), or a vascular endothelial growth factor (VEGF), or an analogue or a variant thereof;

15 (88) a modifier capable of modifying a protein or an analogue or variant thereof according to (86), wherein the basic protein is an osteoclastogenesis inhibitory factor (OCIF) or an analogue or a variant thereof;

20 (89) a modifier capable of modifying a protein or an analogue or variant thereof according to (88), wherein said OCIF or an analogue or variant thereof is natural type or recombinant type OCIF,

(90) a modifier capable of modifying a protein or an analogue or variant thereof
25 according to (88), wherein said OCIF or an analogue or variant thereof is a monomer or a dimer;

(91) a modifier capable of modifying a protein or an analogue or variant thereof according to (88), wherein said OCIF is a monomer of human OCIF having a
30 molecular weight as measured by SDS-PAGE under non-reducing conditions of about 60000 or a dimer of human OCIF having a molecular weight of about 120000 as measured by SDS-PAGE under non-reducing conditions,

26

- (92) a modifier capable of modifying a protein or an analogue or variant thereof according to (88), wherein said OCIF comprises amino acids -21 to +380 of SEQ ID NO 1 of the sequence listing,
- 5 (93) a modifier capable of modifying a protein or an analogue or variant thereof according to (88), wherein said OCIF comprises amino acids +1 to +380 of SEQ ID NO 1 of the sequence listing,
- 10 (94) a complex comprising at least one protein or an analogue or variant thereof which is bound to at least one copolymer or a pharmacologically acceptable salt thereof according to any one of (1) to (74),
- (95) a complex according to (94), wherein the protein is a basic protein,
- 15 (96) a complex according to (95), wherein the basic protein is a basic fibroblast growth factor (bFGF), an epidermal growth factor (EGF), an osteoclastogenesis inhibitory factor (OCIF), a platelet-derived growth factor (PDGF), a brain-derived neurotrophic factor (BDNF), a nerve growth factor (NGF), a human growth hormone (HGH), a hepatocyte growth factor (HGF), or a vascular endothelial growth factor
- 20 (VEGF), or an analogue or a variant thereof;
- (97) a complex according to (95), wherein the basic protein is an osteoclastogenesis inhibitory factor (OCIF) or an analogue or a variant thereof;
- 25 (98) a complex according to (97), wherein said OCIF or an analogue or variant thereof is natural type or recombinant type OCIF,
- (99) a complex according to (97), wherein said OCIF or an analogue or variant thereof is a monomer or a dimer;
- 30 (100) a complex according to (97), wherein said OCIF is a monomer of human OCIF having a molecular weight as measured by SDS-PAGE under non-reducing conditions of about 60000 or a dimer of human OCIF having a molecular weight of about 120000 as measured by SDS-PAGE under non-reducing conditions,
-

(101) a complex according to (97), wherein said OCIF comprises amino acids -21 to +380 of SEQ ID NO 1 of the sequence listing;

5 (102) a complex according to (97), wherein said OCIF comprises amino acids +1 to +380 of SEQ ID NO 1 of the sequence listing,

(103) a pharmaceutical composition comprising an effective amount of a pharmacologically active agent together with a carrier or diluent therefor, wherein
10 said pharmacologically active agent is in the form of a complex according to any one of (94) to (102),

(104) a method for prolonging the time that a protein or an analogue or variant thereof is retained in the bloodstream after administration to a patient by complexing
15 said protein or an analogue or variant thereof with at least one copolymer or a pharmacologically acceptable salt thereof according to any one of (1) to (74),

(105) a method according to (104), wherein the protein is a basic protein,

20 (106) a method according to (105), wherein the basic protein is a basic fibroblast growth factor (bFGF), an epidermal growth factor (EGF), an osteoclastogenesis inhibitory factor (OCIF), a platelet-derived growth factor (PDGF), a brain-derived neurotrophic factor (BDNF), a nerve growth factor (NGF), a human growth hormone (HGH), a hepatocyte growth factor (HGF), or a vascular endothelial growth factor
25 (VEGF), or an analogue or a variant thereof;

(107) a method according to (105), wherein the basic protein is an osteoclastogenesis inhibitory factor (OCIF) or an analogue or a variant thereof;

30 (108) a method according to (107), wherein said OCIF or an analogue or variant thereof is natural type or recombinant type OCIF,

(109) a method according to (107), wherein said OCIF or an analogue or variant thereof is a monomer or a dimer;

27

- 5 (110) a method according to (107), wherein said OCIF is a monomer of human OCIF having a molecular weight as measured by SDS-PAGE under non-reducing conditions of about 60000 or a dimer of human OCIF having a molecular weight of about 120000 as measured by SDS-PAGE under non-reducing conditions,
- (111) a method according to (107), wherein said OCIF comprises amino acids -21 to +380 of SEQ ID NO 1 of the sequence listing;
- 10 (112) a method according to (107), wherein said OCIF comprises amino acids +1 to +380 of SEQ ID NO 1 of the sequence listing;
- 15 (113) a method for the treatment or prophylaxis of a disease in a patient that is susceptible to a protein or an analogue or variant thereof comprising administering to said patient an effective amount of a complex comprising said protein or an analogue or variant thereof which is bound to at least one copolymer or a pharmacologically acceptable salt thereof according to any one of (1) to (74),
- 20 (114) a method according to (113), wherein the protein is a basic protein,
- (115) a method according to (114), wherein the basic protein is a basic fibroblast growth factor (bFGF), an epidermal growth factor (EGF), an osteoclastogenesis inhibitory factor (OCIF), a platelet-derived growth factor (PDGF), a brain-derived neurotrophic factor (BDNF), a nerve growth factor (NGF), a human growth hormone
- 25 (HGH), a hepatocyte growth factor (HGF), or a vascular endothelial growth factor (VEGF), or an analogue or a variant thereof;
- (116) a method according to (114), wherein the basic protein is an osteoclastogenesis inhibitory factor (OCIF) or an analogue or a variant thereof;
- 30 (117) a pharmaceutical composition according to (116), wherein said OCIF or an analogue or variant thereof is natural type or recombinant type OCIF;

- (118) a method according to (116), wherein said OCIF or an analogue or variant thereof is a monomer or a dimer,
- (119) a method according to (116), wherein said OCIF is a monomer of human
5 OCIF having a molecular weight as measured by SDS-PAGE under non-reducing conditions of about 60000 or a dimer of human OCIF having a molecular weight of about 120000 as measured by SDS-PAGE under non-reducing conditions,
- (120) a method according to (116), wherein said OCIF comprises amino acids -21 to
10 +380 of SEQ ID NO 1 of the sequence listing;
- (121) a method according to (116), wherein said OCIF comprises amino acids +1 to +380 of SEQ ID NO 1 of the sequence listing;
- (122) a method according to any one of (116) to (121), wherein said disease is a
15 bone metabolic disease,
- (123) use of complex comprising a protein or an analogue or variant thereof which is bound to at least one copolymer or a pharmacologically acceptable salt thereof
20 according to any one of (1) to (74) in the manufacture of a medicament for the prophylaxis or treatment of a disease susceptible to said protein or an analogue or variant thereof,
- (124) use according to (123), wherein the protein is a basic protein,
25
- (125) use according to (123), wherein the basic protein is a basic fibroblast growth factor (bFGF), an epidermal growth factor (EGF), an osteoclastogenesis inhibitory factor (OCIF), a platelet-derived growth factor (PDGF), a brain-derived neurotrophic factor (BDNF), a nerve growth factor (NGF), a human growth hormone (HGH), a
30 hepatocyte growth factor (HGF), or a vascular endothelial growth factor (VEGF), or an analogue or a variant thereof;
- (126) use according to (123), wherein the basic protein is an osteoclastogenesis inhibitory factor (OCIF) or an analogue or a variant thereof;

28

(127) use according to (126), wherein said OCIF or an analogue or variant thereof is natural type or recombinant type OCIF;

5 (128) use according to (126), wherein said OCIF or an analogue or variant thereof is a monomer or a dimer;

(129) use according to (126), wherein said OCIF is a monomer of human OCIF having a molecular weight as measured by SDS-PAGE under non-reducing conditions of about 60000 or a dimer of human OCIF having a molecular weight of about
10 120000 as measured by SDS-PAGE under non-reducing conditions,

(130) use according to (126), wherein said OCIF comprises amino acids -21 to +380 of SEQ ID NO 1 of the sequence listing,

15

(131) use according to (126), wherein said OCIF comprises amino acids +1 to +380 of SEQ ID NO 1 of the sequence listing; and

(132) use according to any one of (126) to (131), wherein said disease is a bone
20 metabolic disease.

The "alkylene group having from 1 to 6 carbon atoms" in the definition of substituent Alk in formula (I) above is a straight- or branched-chain alkylene group having from 1 to 6 carbon atoms such as a methylene, methylenemethylene, ethylene,
25 propylene, trimethylene, tetramethylene, 1-methyltrimethylene, 2-methyltrimethylene, 3-methyltrimethylene, pentamethylene or hexamethylene group. Among these alkylene groups, straight- or branched-chain alkylene groups having 1 to 4 carbon atoms are preferred, ethylene or trimethylene groups are more preferred and an ethylene group is most preferred.

30

The alkyl group in the "alkyl group having from 1 to 6 carbon atoms that may optionally be substituted with at least one substituent selected from the group consisting of hydroxy groups, halogen atoms and aryl groups having from 6 to 14 carbon atoms that may optionally be substituted with from 1 to 5 substituents selected

from Substituents A defined below" in the definition of substituents R^1 , R^2 , R^4 , R^5 and Substituents A in formulae (I) and (II) above is a straight- or branched-chain alkyl group having from 1 to 6 carbon atoms such as a methyl, ethyl, n-propyl, isopropyl, n-butyl, isobutyl, s-butyl, tert-butyl, n-pentyl, isopentyl, 2-methylbutyl, neopentyl, 1-ethylpropyl, n-hexyl, isohexyl, 4-methylpentyl, 3-methylpentyl, 2-methylpentyl, 1-methylpentyl, 3,3-dimethylbutyl, 2,2-dimethylbutyl, 1,1-dimethylbutyl, 1,2-dimethylbutyl, 1,3-dimethylbutyl, 2,3-dimethylbutyl or 2-ethylbutyl group. Among these alkyl groups, straight- or branched-chain alkyl groups having 1 to 4 carbon atoms are preferred, methyl and ethyl groups are more preferred and a methyl group is most preferred.

The alkoxy group in the "alkoxy group having from 1 to 6 carbon atoms that may optionally be substituted with at least one substituent selected from the group consisting of hydroxy groups, halogen atoms and aryl groups having from 6 to 14 carbon atoms that may optionally be substituted with from 1 to 5 substituents selected from Substituents A defined below" in the definition of substituent R^3 and Substituents A in formulae (I) and (II) above is a substituent in which the abovementioned alkyl group having from 1 to 6 carbon atoms is bound to an oxygen atom. Examples of such an alkoxy group include straight- or branched-chain alkoxy groups having 1 to 6 carbon atoms such as a methoxy, ethoxy, n-propoxy, isopropoxy, n-butoxy, isobutoxy, s-butoxy, tert-butoxy, n-pentyloxy, isopentyloxy, 2-methylbutoxy, neopentyloxy, n-hexyloxy, 4-methylpentyloxy, 3-methylpentyloxy, 2-methyl-pentyloxy, 3,3-dimethylbutoxy, 2,2-dimethylbutoxy, 1,1-dimethylbutoxy, 1,2-dimethylbutoxy, 1,3-dimethylbutoxy, and 2,3-dimethylbutoxy groups. Among these alkoxy groups, straight- or branched-chain alkoxy groups having from 1 to 4 carbon atoms are more preferred and an ethoxy group is most preferred.

The "halogen atom" that is one of the "Substituents A" above, is an optional substituent on the "alkyl group having from 1 to 6 carbon atoms that may optionally be substituted with at least one substituent selected from the group consisting of hydroxy groups, halogen atoms and aryl groups having from 6 to 14 carbon atoms that may optionally be substituted with from 1 to 5 substituents selected from Substituents A defined below" in the definition of substituents R^1 , R^2 , R^4 and R^5 in formulae (I) and (II) above and is an optional substituent on the "alkoxy group having from 1 to 6

29

carbon atoms that may optionally be substituted with at least one substituent selected from the group consisting of hydroxy groups, halogen atoms and aryl groups having from 6 to 14 carbon atoms that may optionally be substituted with from 1 to 5 substituents selected from Substituents A defined below" in the definition of substituent R³ in formula (II) above is a fluorine atom, a chlorine atom, a bromine atom or an iodine atom, and preferably it is a fluorine atom or a chlorine atom.

The "aryl group having from 6 to 14 carbon atoms" that is an optional substituent on the "alkyl group having from 1 to 6 carbon atoms that may optionally be substituted with at least one substituent selected from the group consisting of hydroxy groups, halogen atoms and aryl groups having from 6 to 14 carbon atoms that may optionally be substituted with from 1 to 5 substituents selected from Substituents A defined below" in the definition of substituents R¹, R², R⁴ and R⁵ and an optional substituent on the "alkoxy group having from 1 to 6 carbon atoms that may optionally be substituted with at least one substituent selected from the group consisting of hydroxy groups, halogen atoms and aryl groups having from 6 to 14 carbon atoms" in the definition of substituent R³ in formula (II) above is an aromatic hydrocarbon group having from 6 to 14 carbon atoms and may be, for example, a phenyl, indenyl, naphthyl, phenanthryl or anthryl group. Preferably it is a phenyl group

The "aryloxy group having from 6 to 14 carbon atoms that may optionally be substituted with from 1 to 5 substituents selected from Substituents A" in the definition of substituent R³ in formula (II) above is an aryl group as defined above that is bonded to an oxygen atom and may be, for example, a phenoxy, indenyloxy, naphthyloxy, phenanthryloxy or anthryloxy group. Preferably it is a phenoxy group

The "alkyl group having from 1 to 6 carbon atoms that is optionally substituted with at least one halogen atom" in the definition of substituents R¹, R², R⁴ and R⁵ in formulae (I) and (II) above is an alkyl group having from 1 to 6 carbon atoms as described above that is substituted with at least one halogen atom as described above and may be, for example, a trifluoromethyl group, a trichloromethyl group, a difluoromethyl group, a dichloromethyl group, a dibromomethyl group, a fluoromethyl group, a 2,2,2-trifluoroethyl group, a 2,2,2-trichloroethyl group, a 2-bromoethyl group, a 2-chloroethyl group, a 2-fluoroethyl group, a 2-iodoethyl group,

a 3-chloropropyl group, a 4-fluorobutyl group, a 6-iodohexyl group, a 2,2-dibromoethyl group or a pentafluoroethyl group. Preferably it is a trifluoromethyl group, a trichloromethyl group, a difluoromethyl group or a pentafluoroethyl group, and most preferably it is a trifluoromethyl group

5

Examples of the "alkyl group having from 1 to 6 carbon atoms that is optionally substituted with at least one hydroxy group" in the definition of substituents R^1 , R^4 and R^5 in formulae (I) and (II) above include a hydroxymethyl group, a 1-hydroxyethyl group, a 1-hydroxypropyl group and a 2-hydroxypropyl group.

10

The "alkoxy group having from 1 to 6 carbon atoms that is optionally substituted with at least one halogen atom" in the definitions of substituent R^3 in formula (II) above is an alkoxy group having from 1 to 6 carbon atoms as described above that is substituted with at least one halogen atom as described above and may be, for example, a trifluoromethoxy group, a trichloromethoxy group, a difluoromethoxy group, a dichloromethoxy group, a dibromomethoxy group, a fluoromethoxy group, a 2,2,2-trifluoroethoxy group, a 2,2,2-trichloroethoxy group, a 2-bromoethoxy group, a 2-chloroethoxy group, a 2-fluoroethoxy group, a 2-iodoethoxy group, a 3-chloropropoxy group, a 4-fluorobutoxy group, a 6-iodohexyloxy group, a 2,2-dibromoethoxy group or a pentafluoroethoxy group, preferably it is a C_1 - C_4 alkoxy group substituted with fluorine or chlorine atoms such as a trifluoromethoxy group, a trichloromethoxy group, a difluoromethoxy group or a pentafluoroethoxy group. More preferably it is a trifluoromethoxy group.

15

20

25

Examples of the "alkoxy group having from 1 to 6 carbon atoms that is optionally substituted with at least one hydroxy group" in the definition of substituent R^3 in formula (II) above include a hydroxymethoxy group, a 1-hydroxyethoxy group, a 1-hydroxypropoxy group and a 2-hydroxypropoxy group

30

The "alkyl group having from 1 to 6 carbon atoms that is optionally substituted with at least one aryl group having from 6 to 14 carbon atoms that may optionally be substituted with from 1 to 5 substituents selected from Substituents A" in the definition of substituents R^1 , R^2 , R^4 and R^5 in formulae (I) and (II) above may be, for

example, a benzyl group, an 1-naphthylmethyl group, a 2-naphthylmethyl group, an indenylmethyl group, a 1-phenethyl group, a 2-phenethyl group, a 1-naphthylethyl group, a 2-naphthylethyl group, a 1-phenylpropyl group, a 2-phenylpropyl group, a 3-phenylpropyl group, a 1-naphthylpropyl group, a 2-naphthylpropyl group, a 3-naphthylpropyl group, a 1-phenylbutyl group, a 2-phenylbutyl group, a 3-phenylbutyl group, a 4-phenylbutyl group, a 1-naphthylbutyl group, a 2-naphthylbutyl group, a 3-naphthylbutyl group, a 4-naphthylbutyl group, a 1-phenylpentyl group, a 2-phenylpentyl group, a 3-phenylpentyl group, a 4-phenylpentyl group, a 5-phenylpentyl group, a 1-phenylhexyl group, a 2-phenylhexyl group, a 3-phenylhexyl group, a 4-phenylhexyl group, a 5-phenylhexyl group or a 6-phenylhexyl group, preferably it is an alkyl group substituted with an aryl group having from 6 to 10 carbon atoms such as a benzyl group, an 1-naphthylmethyl group, a 2-naphthylmethyl group, a 1-phenethyl group, a 2-phenethyl group, a 1-naphthylethyl group, a 2-naphthylethyl group, a 1-phenylpropyl group, a 2-phenylpropyl group, a 3-phenylpropyl group or a 1-naphthylpropyl group, and more preferably it is a benzyl group

The "alkoxy group having from 1 to 6 carbon atoms that is optionally substituted with at least one aryl group having from 6 to 14 carbon atoms that may optionally be substituted with from 1 to 5 substituents selected from Substituents A" in the definition of substituent R³ in formulae (II) above may be, for example, a benzoxy group, a 1-naphthylmethoxy group, a 2-naphthylmethoxy group, an indenylmethoxy group, a 1-phenethoxy group, a 2-phenethoxy group, a 1-naphthylethoxy group, a 2-naphthylethoxy group, a 1-phenylpropoxy group, a 2-phenylpropoxy group, a 3-phenylpropoxy group, a 1-naphthylpropoxy group, a 2-naphthylpropoxy group, a 3-naphthylpropoxy group, a 1-phenylbutoxy group, a 2-phenylbutoxy group, a 3-phenylbutoxy group, a 4-phenylbutoxy group, a 1-naphthylbutoxy group, a 2-naphthylbutoxy group, a 3-naphthylbutoxy group, a 4-naphthylbutoxy group, a 1-phenylpentoxy group, a 2-phenylpentoxy group, a 3-phenylpentoxy group, a 4-phenylpentoxy group, a 5-phenylpentoxy group, a 1-phenylhexyloxy group, a 2-phenylhexyloxy group, a 3-phenylhexyloxy group, a 4-phenylhexyloxy group, a 5-phenylhexyloxy group or a 6-phenylhexyloxy group, preferably it is an alkyl group substituted with an aryl group having from 6 to 10 carbon atoms such as a benzoxy group, an 1-naphthylmethoxy group, a 2-naphthylmethoxy group, a 1-phenethoxy

group, a 2-phenethoxy group, a 1-naphthylethoxy group, a 2-naphthylethoxy group, a 1-phenylpropoxy group, a 2-phenylpropoxy group, a 3-phenylpropoxy group or a 1-naphthylpropoxy group, and more preferably it is a benzoxy group

5 Where R^3 is an "aryloxy group having from 6 to 14 carbon atoms that may optionally be substituted with from 1 to 5 substituents selected from Substituents A", it is preferably an aryloxy group having from 6 to 10 carbon atoms that is optionally substituted with from 1 to 3 substituents selected from Substituent Group A, more preferably, it is a phenoxy group that is optionally substituted with from 1 to 3
10 substituents selected from Substituent Group A, still more preferably, it is a phenoxy group optionally substituted with from 1 to 3 halogen atoms, alkyl groups having from 1 to 6 carbon atoms, hydroxy groups or nitro groups, and, most preferably, it is a phenoxy group or a p-nitrophenoxy group

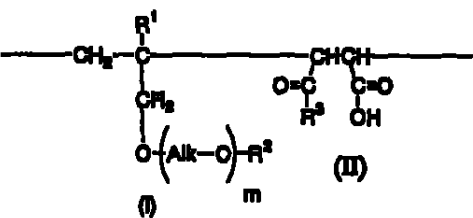
15 Where the copolymer of the present invention has a basic group, the compound can be converted to a pharmacologically acceptable salt thereof by reacting some or all of these basic groups with an acid. Furthermore, the copolymers of the present invention have acidic carboxyl groups and the copolymer can be converted to a pharmacologically acceptable salt thereof by reacting some or all of these carboxyl
20 groups with a base.

Preferred examples of the pharmacologically acceptable salts formed with a basic group present in the copolymers of the present invention include inorganic acid salts such as hydrohalogenated acid salts (e.g. hydrochlorides, hydrobromides and
25 hydroiodides), nitrates, perchlorates, sulfates and phosphates, organic acid salts such as lower alkanesulfonates in which the lower alkyl moiety thereof is as defined above (e.g. methanesulfonates, trifluoromethanesulfonates and ethanesulfonates), arylsulfonates in which the aryl moiety thereof is as defined above (e.g. benzenesulfonate or p-toluenesulfonate), acetates, malates, fumarates, succinates,
30 citrates, ascorbates, tartrates, oxalates and maleates, and amino acid salts such as glycine salts, lysine salts, arginine salts, ornithine salts, glutamates and aspartates. Hydrohalogenated acid salts are particularly preferred

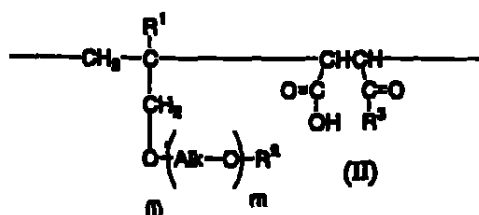
Preferred examples of the pharmacologically acceptable salts formed with an acidic carboxyl group present in the copolymers of the present invention include metal salts such as alkali metal salts (e.g. sodium salts, potassium salts and lithium salts), alkali earth metal salts (e.g. calcium salts and magnesium salts), metal salts such as aluminum salts, iron salts zinc salts, copper salts, nickel salts and cobalt salts, amine salts such as inorganic amine salts (e.g. ammonium salts) and organic amine salts (e.g. t-octylamine salts, dibenzylamine salts, morpholine salts, glucosamine salts, phenylglycinealkyl ester salts, ethylenediamine salts, N-methylglucamine salts, guanidine salts, diethylamine salts, triethylamine salts, dicyclohexylamine salts, N,N'-dibenzylethylenediamine salts, chlorprocaine salts, procaine salts, diethanolamine salts, N-benzylphenethylamine salts, piperazine salts, tetramethylammonium salts and tris(hydroxymethyl)aminomethane salts, and amino acid salts such as glycine salts, lysine salts, arginine salts, ornithine salts, glutamates and aspartates. Alkali metal salts and alkali earth metal salts are particularly preferred

In the present invention, the "structural unit" is defined as a minimum constitutional unit of the copolymer of the invention and is depicted in the definition of the copolymer above as a unit of formula (I) or a unit of formula (II). The "structural unit" is not the structure of a monomer starting material used in a polymerization reaction in the synthesis of a copolymer of the present invention, rather, it is the unit that is derived from said monomer starting material and is present in said copolymer of the present invention

In the present invention, the phrase "head-to-head sequence" means that the structural units represented by the formulae (I) and (II) are arranged as shown by the following formula



In the present invention, the phrase "head-to-tail sequences" means that the structural units represented by the formulae (I) and (II) are arranged as shown by the following formula



In the present invention, the copolymers and pharmacologically acceptable salts thereof may be alternating copolymers or random copolymers. Alternating copolymers are those in which the ratio of the structural units of formula (I) to the structural units of formula (II) is 1:1 and the structural units represented by the formula (I) and the structural units represented by the formula (II) are arranged in an alternating head-to-head sequence, an alternating head-to-tail sequence or an alternating mixed sequence of head-to-head and head-to-tail. Random copolymers are those in which the structural units represented by the formula (I) and the structural units represented by the formula (II) are arranged in a random sequence.

In the present invention, the "composition ratio" is the average ratio of the number of structural units represented by formula (I) to the number of structural units represented by formula (II) in a copolymer of the present invention. When a copolymer is substantially an alternating copolymer, the composition ratio will be 1:1. When a copolymer is a random copolymer, however, said ratio can be varied. In the copolymers of the present invention, said ratio is not particularly limited, and typically it might be in a range of from 10:1 to 1:10, preferably from 3:1 to 1:3, more preferably from 2:1 to 1:2 or 1:2 to 1:6, and most preferably it is either 1:1 or from 1:2 to 1:4. It should be noted that the composition ratio values inevitably vary somewhat depending on slight changes in starting materials, polymerisation conditions and the like. As a result, the composition ratios given are approximate values, variations of up to $\pm 30\%$ on the values for the composition ratios given above are still considered to be within the scope of said ratios.

32

The composition ratio of the copolymers of the present invention can be determined by using known analytical techniques. By determining the carboxyl group content of the copolymer (mmol/g) by conductometric titration [the determination requiring the preparation of the corresponding completely hydrolysed copolymer (i.e. R^3 is OH), either by hydrolysing the copolymer being analysed or by synthesising the corresponding hydrolysed copolymer separately] and from a knowledge of the formula weights of each of the structural units of said copolymer, it is possible to determine the composition ratio using the following formula.

$$R_{II}/R_I = (C \times FW_I)/(2000 - C \times FW_{II})$$

wherein R_I is the average number of structural units (I), R_{II} is the average number of structural units (II), C is the carboxyl group content of the copolymer (mmol/g), FW_I is the formula weight of the structural unit (I) and FW_{II} is the formula weight of the structural unit (II)

Generally, the molecular weight of a polymer is determined as a relative molecular weight against that of a standard compound which contains a similar structure to that of said polymer and has a known absolute molecular weight value. Such an evaluation method is often used in the determination of the molecular weight of novel copolymers such as those of present invention.

The average molecular weight of the copolymer of present invention is the value measured by gel filtration chromatography using a polymer having known absolute molecular weight as a standard compound. The nature of the gel, the elution conditions and the polymer of known absolute molecular weight used as the comparison can be appropriately chosen by the person of ordinary skill using known techniques and general knowledge, e.g. see "Comprehensive Polymer Science", pub Pergamon Press (Oxford) 1989. The standard compound used for comparison purposes is preferably a polymer having a similar structure and properties. For the copolymers of the present invention, the side chain portion is considered to be a characteristic structure. Therefore, the standard compound used for comparison is preferably a polymer containing a similar structure to that of the side chain portion of

the copolymer of the present invention whose average molecular weight is to be measured. More preferably the standard compound used is a poly(ethylene glycol)

5 In the present invention, the "average degree of polymerization" is an average value of the degree of polymerization of the structural units in the copolymer of the present invention, i.e. it is the average number of structural units in said copolymer. It is determined on the basis of the average molecular weight of the copolymer, the formula weights of each of the structural units of said copolymer and the composition ratio of the structural units of said copolymer. The "average degree of
10 polymerisation" of a copolymer of the present invention having structural units I and II can be calculated using the following formula

$$\text{Average degree of polymerisation} = M_c / (F_{wI} \times R_I + F_{wII} \times R_{II})$$

15 wherein M_c is the average molecular weight of the copolymer, F_{wI} and F_{wII} are the formula weights for each of the structural units I and II respectively and R_I and R_{II} represent the proportions of structural units I and II in the copolymer calculated from the composition ratio (composition ratio = $R_I : R_{II}$, $R_I + R_{II} = 1$)

20 In the above formula for determining the average degree of polymerisation of a copolymer of the present invention, the value of the composition ratio of the structural units, the average molecular weight of the copolymer and the formula weights of the structural units can all be determined as discussed above. In order to do so, it is necessary to prepare the corresponding completely hydrolysed,
25 ammonolysed, aminolysed or alcoholysed copolymer (preferably the corresponding completely hydrolysed copolymer). Alternatively, if the starting copolymer used in the preparation of the copolymer of the present invention is of known composition, these values can be determined without the need for analysis. The average degree of polymerization in the copolymers of the present invention is not particularly limited
30 Typically, it is in a range of from 5 to 200; preferably it is from 5 to 50; more preferably from 5 to 20 or 20 to 30 or 30 to 40

In the copolymers of the present invention, the structural units of formula (II) can comprise at least one structural unit of formula (II) wherein R^3 is an optionally

substituted alkoxy group having from 1 to 6 carbon atoms, an optionally substituted
aryloxy group or a group represented by the formula $-NR^4R^5$ and optionally at least
one structural unit represented by the formula (II) in which R^3 is a hydroxyl group
The ratio between the structural units represented by the formula (II) in which R^3 is a
5 hydroxy group and the structural units represented by the formula (II) in which R^3 is
an optionally substituted alkoxy group, an optionally substituted aryloxy group or a
group represented by the formula $-NR^4R^5$ is referred to as the hydrolysis ratio. By
determining the carboxyl group content of the copolymer (mmol/g) by
conductometric titration and from a knowledge of the formula weights of each of the
10 structural units of said copolymer and the composition ratio (see above), it is possible
to determine the hydrolysis ratio H/A using the following formula.

$$\frac{A}{H+A} = \frac{2000 \times (R_H/R_I) - C \times [FW_I + FW_{II} \times (R_{II}/R_I)]}{(R_H/R_I) \times [C \times (FW(A)_{II} - FW_H) + 1000]}$$

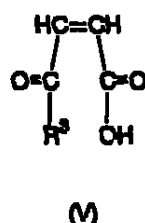
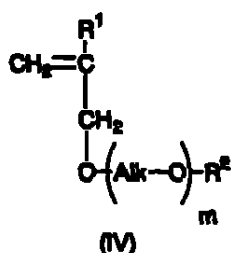
15 wherein H/A is the hydrolysis ratio, R_I/R_{II} is the composition ratio, C is the
carboxyl group content of the copolymer (mmol/g), FW_I is the formula weight of the
structural unit (I), FW_{II} is the formula weight of the structural unit (II) wherein R^3 is
OH and $FW(A)_{II}$ is the formula weight of the structural unit (II) wherein R^3 is an
20 optionally substituted alkoxy group, an optionally substituted aryloxy group or a
group represented by the formula $-NR^4R^5$

Preferred ranges for the hydrolysis ratio are 5.5 to 0.10, 4.6 to 0.10, 3.7 to
0.10, 2.8 to 0.10 and 1.9 to 0.10. It should be noted that the hydrolysis ratio values
25 inevitably vary somewhat depending on slight changes in starting materials, reaction
conditions and the like. As a result, the hydrolysis ratios stated in the present
application are approximate values, variations of up to $\pm 30\%$ on the values for the
hydrolysis ratios stated in the present application are still considered to be within the
scope of said ratios.

30 The molecular size of the copolymers of the invention can be measured using
known analytical techniques such as size exclusion chromatography using proteins of
known molecular size as standards (Examples 15 and 16 below provide examples of
the use of such a technique). Using size exclusion chromatography, the molecular

size of a copolymer is given as its Stokes radius. In the present invention, the molecular size of the copolymers is not particularly limited. Typically, the Stokes radius of the copolymers of the present invention is 9.3 nm or less, preferably it is 7.3 nm or less, more preferably it is 6.2 nm or less, 4.7 nm or less or 3.1 nm or less, or it is in a range of from 3.1 to 6.2 nm or 1.5 to 4.7 nm

The copolymers and pharmacologically acceptable salts thereof of the present invention can be obtained by a suitable copolymerization reaction known to those skilled in the art [see, for example, "Comprehensive Polymer Science" published by Pergamon Press (Oxford) in 1989] using starting monomers represented by the following formulae (IV) and (V)



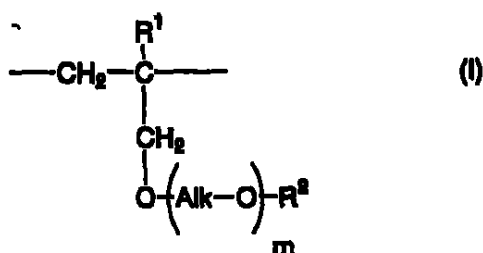
(wherein m, Alk, and R¹, R² and R³ are as defined above) In order to obtain a copolymer having a particular desired average degree of polymerization or molecular weight, the obtained copolymer may be fractionated using gel filtration chromatography

The monomers are known in the art or can easily be obtained according to a method well known to those skilled in the art [see, for example, J M Harris, "Laboratory synthesis of polyethylene glycol derivatives", Rev Macromol Chem. Phys C25, 326-373 (1985) and Japanese Patent No. 2621308] Monomers represented by the formula (V) can be easily obtained by subjecting maleic anhydride to one or more reactions selected from the group consisting of (a) hydrolysis, (b) ammonolysis, (c) aminolysis and (d) alcoholysis

34

Alternatively, a copolymer or a pharmacologically acceptable salt thereof can be obtained by subjecting one or more carboxylic anhydride moieties of formula (III) in a copolymer which contains, as constitutional units,

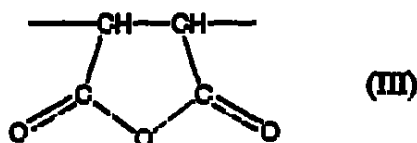
- (a) one or more structural units which may be the same or different from each other and which are represented by the formula (I) below



wherein

m , Alk, R^1 and R^2 are as defined above, and

- (b) said structural unit comprising a carboxylic anhydride moiety of formula (III)



- to one or more reactions selected from the group consisting of (i) hydrolysis, (ii) ammonolysis, (iii) ammolysis and (iv) alcoholysis. The starting copolymers having units of formulae (I) and (III) are either well known in the art (for example, copolymers such as AM-0530K and AM-1510K can be purchased from NOF Corporation) or can be easily prepared according to a method well known to those skilled in the art [see, for example, Yoshimoto et al., "Polyethylene glycol derivative-modified cholesterol oxidase soluble and active in benzene", Biochem. Biophys. Res. Comm. 148, 876-882 (1987), Japanese Patent No 2621308, Japanese Patent Application Publication No 2003-105040 and Japanese Patent Application Publication No 2003-105003]

- To obtain a copolymer having a desired average degree of polymerization or desired molecular weight, the obtained copolymer may be fractionated by gel filtration chromatography

In the present invention, copolymers of the present invention can be obtained by subjecting one or more carboxylic anhydride moieties of formula (III) to one or more reactions selected from the group consisting of (i) hydrolysis, (ii) ammonolysis, (iii) aminolysis and (iv) alcoholysis

In the present invention, "hydrolysis" means a ring opening reaction of a carboxylic anhydride moiety of formula (III) with water to give a structural unit of formula (II) wherein R^3 is a hydroxy group. The nature of the actual hydrolysis reaction is not particularly limited as long as it is a method commonly employed by those skilled in the art.

Examples of a suitable solvent to be used in the hydrolysis reaction include water; ethers such as diethyl ether, diisopropyl ether, tetrahydrofuran, dioxane, dimethoxyethane, and diethylene glycol dimethyl ether; and amides such as formamide, N,N-dimethylformamide, N,N-dimethylacetamide, N-methyl-2-pyrrolidone, N-methylpyrrolidinone, and hexamethylphosphorotriamide. Of these solvents, water or dioxane are preferred.

The reagent to be used is suitably water. If water is used as the solvent, then there is no necessity to add extra water. Additionally, a base may be added for the purpose of accelerating the reaction. Examples of such a base include inorganic bases such as alkali metal carbonates (e.g., sodium carbonate, potassium carbonate and lithium carbonate), alkali metal hydrogencarbonates (e.g., sodium hydrogencarbonate, potassium hydrogencarbonate and lithium hydrogencarbonate), alkali metal hydrides (e.g., lithium hydride, sodium hydride and potassium hydride), alkali metal hydroxides (e.g., sodium hydroxide, potassium hydroxide, barium hydroxide and lithium hydroxide), alkali metal fluorides (e.g., sodium fluoride and potassium fluoride), and organic bases such as alkali metal alkoxides (e.g., sodium methoxide, sodium ethoxide, potassium methoxide, potassium ethoxide, potassium *t*-butoxide and lithium methoxide), N-methylmorpholine, triethylamine, tripropylamine, tributylamine, diisopropylethylamine, dicyclohexylamine, N-methylpiperidine, pyridine, 4-pyrrolidinopyridine, picoline, 4-(N,N-dimethylamino)pyridine, 2,6-di(*t*-butyl)-4-methylpyridine, quinoline, N,N-dimethylaniline, N,N-diethylaniline, 1,5-

diazabicyclo[4.3.0]non-5-ene (DBN), 1,4-diazabicyclo[2.2.2]octane (DABCO) and 1,8-diazabicyclo[5.4.0]undec-7-ene (DBU). Of these bases, organic bases are preferred and pyridine is most preferred. In this regard, it is to be noted that where the hydrolysis reaction proceeds satisfactorily in the absence of a base, there is no necessity to add a base.

The reaction temperature varies depending on the starting compound and the reagent, but is usually in the range of from 0 to 100°C and preferably in the range of from 20 to 60°C.

The reaction time varies depending on the reaction temperature, the starting compound, the reagent and the kind of solvent used, but is usually in the range of from 10 minutes to 3 days and preferably in the range of from 6 hours to 24 hours.

After completion of the reaction, the desired compound of the hydrolysis reaction can be isolated from the reaction mixture by a conventional method known to the person skilled in the art. For example, the resultant reaction mixture can be condensed using an ultrafiltration membrane and then freeze-dried to obtain the target compound of the reaction. Alternatively, the desired compound can be used as a solution without isolation thereof where it is to be used for modification of proteins.

The desired compound thus obtained, if necessary, can be further purified by a conventional technique such as, for example, gel filtration chromatography. To obtain a compound having a particular desired average degree of polymerization or desired molecular weight, the purified compound may be further fractionated using gel filtration chromatography.

In the present invention, "ammonolysis" means a ring opening reaction of a carboxylic anhydride moiety of formula (III) with ammonia to give a moiety of formula (II) wherein R³ is an amino group. The nature of the actual ammonolysis reaction is not particularly limited as long as it is a method commonly employed by those skilled in the art.

Examples of a suitable solvent to be used include water, ethers such as diethyl ether, diisopropyl ether, tetrahydrofuran, dioxane, dimethoxyethane, and diethylene glycol dimethyl ether; and amides such as formamide, N,N-dimethylformamide, N,N-dimethylacetamide, N-methyl-2-pyrrolidone, N-methylpyrrolidinone and
5 hexamethylphosphorotriamide. Of these solvents, water or dioxane are preferred. It is to be noted that the reagent to be used may also be used as the solvent.

Examples of suitable reagents to be used include ammonia gas and ammonia water, and ammonia is preferred
10

The reaction temperature varies depending on the starting material and the reagent, but is usually in the range of from 0 to 100°C and preferably in the range of from 10 to 40°C.

15 The reaction time varies depending on the reaction temperature, the starting compound, the reagent and the kind of solvent used, but is usually in the range of from 10 minutes to 3 days and preferably in the range of from 6 hours to 24 hours

After completion of the reaction, the desired compound of the ammonolysis
20 reaction can be isolated from the reaction mixture by a conventional method known to the person skilled in the art. The resultant reaction mixture can be, for example, worked up as follows to isolate the target compound (1) dialysis through a semi-permeable membrane by the use of an acid such as an aqueous acetic acid solution to remove excess ammonia (the dialysis is carried out under such conditions that the
25 reaction mixture solution does not become acidic, adding water as necessary), followed by condensation using an ultrafiltration membrane and then freeze-drying of the condensate thus obtained, or (2) addition of an aqueous sodium hydroxide solution and an immiscible organic solvent such as diethyl ether, shaking the resulting mixture (shaking may be carried out two or more times, as necessary) and then the separated
30 aqueous layer containing the target compound is freeze-dried to obtain the target compound. Alternatively, the desired compound can be used as a solution without isolation thereof where it is to be used for modification of proteins

26

The desired compound thus obtained, if necessary, can be further purified by a conventional technique such as, for example, gel filtration chromatography. To obtain a compound having a particular desired average degree of polymerization or desired molecular weight, the purified compound may be further fractionated using gel filtration chromatography.

It should be noted that the target compound of the ammonolysis reaction can contain structural units of formula (II) wherein R^3 is a hydroxy group as a result of the hydrolysis of some units of formula (III) in the starting material by water present in the solvent or the reagent. It should also be noted that a base may be added to the target compound for improved storage.

In the present invention, "aminolysis" means a ring opening reaction of a carboxylic anhydride moiety of formula (III) with an amine to give a moiety of formula (II) wherein R^3 is a group of formula $-NR^4R^5$, wherein R^4 and R^5 are as defined above. The nature of the actual aminolysis reaction is not particularly limited as long as it is a method commonly employed by those skilled in the art.

Examples of a suitable solvent to be used include water; ethers such as diethyl ether, diisopropyl ether, tetrahydrofuran, dioxane, dimethoxyethane, and diethylene glycol dimethyl ether; and amides such as formamide, 1,1,N-dimethylformamide, N,N-dimethylacetamide, N-methyl-2-pyrrolidone, N-methylpyrrolidone and hexamethylphosphorotriamide. Of these solvents, water or dioxane are preferred. It is to be noted that the reagent to be used may also be used as the solvent.

The reagent to be used obviously depends upon the nature of the target group of formula $-NR^4R^5$. Amines typically used include methylamine, dimethylamine, ethylamine, diethylamine, 2-hydroxyethylamine, di-2-hydroxyethylamine, n-propylamine, di-n-propylamine, isopropylamine, diisopropylamine, 1-amino-2-propanol and 2-hydroxyisopropylamine, and aqueous solutions thereof. Of these reagents, preferred reagents include an aqueous dimethylamine solution and 1-amino-2-propanol, an aqueous dimethylamine solution is most preferred.

The reaction temperature varies depending on the starting compound and the reagent but is usually in the range of from 0 to 100°C and preferably in the range of from 10 to 40°C.

5 The reaction time varies depending on the reaction temperature, the starting compound, the reagent, and the kind of solvent used, but is usually in the range of from 10 minutes to 3 days and preferably in the range of from 6 hours to 36 hours

10 After completion of the reaction, the desired compound of the aminolysis reaction can be isolated from the reaction mixture by a conventional method known to the person skilled in the art. The resultant reaction mixture can be, for example, worked up as follows to isolate the target compound (1) dialysis through a semi-permeable membrane by the use of an acid such as an aqueous acetic acid solution to remove excess ammonia (the dialysis is carried out under such conditions that the
15 reaction mixture solution does not become acidic, adding water as necessary), followed by condensation using an ultrafiltration membrane and then freeze-drying of the condensate thus obtained, or (2) addition of an aqueous sodium hydroxide solution and an immiscible organic solvent such as diethyl ether, shaking the resulting mixture (shaking may be carried out two or more times, as necessary) and then the separated
20 aqueous layer containing the target compound is freeze-dried to obtain the target compound. Alternatively, the desired compound can be used as a solution without isolation thereof where it is to be used for modification of proteins.

25 The desired compound thus obtained, if necessary, can be further purified by a conventional technique such as, for example, a gel filtration column. To obtain a compound having a particular desired average degree of polymerization or desired molecular weight, the purified compound may be further fractionated using gel filtration chromatography

30 It should be noted that the target compound of the aminolysis reaction can contain structural units of formula (II) wherein R³ is a hydroxy group as a result of the hydrolysis of some units of formula (III) in the starting material by water present in

the solvent or the reagent. It should also be noted that a base may be added to the target compound for improved storage.

5 In the present invention, "alcoholysis" means a ring opening reaction of a carboxylic anhydride moiety of formula (III) with an alcohol or an aryl alcohol to give a moiety of formula (II) where R^3 is an alkoxy or aryloxy group as defined above. The nature of the actual alcoholysis reaction is not particularly limited as long as it is a method commonly employed by those skilled in the art.

10 Examples of the solvent to be used in the alcoholysis reaction include water, and amides such as formamide, N,N-dimethylformamide, N,N-dimethylacetamide, N-methyl-2-pyrrolidone, N-methylpyrrolidinone and hexamethylphosphorotriamide. Of these solvents, water is preferred. It is to be noted that the reagent to be used may also be used as the solvent.

15 The reagent to be used obviously depends upon the nature of the target alkoxy or aryloxy group. Typical examples of the alcohol used to obtain the desired alkoxy group include methanol, ethanol, ethylene glycol, n-propanol, propylene glycol, 2-hydroxy-n-propanol and iso-propanol, and aqueous solutions thereof while typical
20 examples of the alcohol used to obtain the desired aryloxy group include phenol and p-nitrophenol. Of these reagents, ethanol is preferred.

The reaction temperature varies depending on the starting compound and the reagent but is usually in the range of from 0 to 100 °C and preferably in the range of
25 from 10 to 40°C.

The reaction time varies depending on the reaction temperature, the starting compound, the reagent and the kind of solvent used but is usually in the range of from 10 minutes to 3 days and preferably in the range of from 6 hours to 36 hours

30 After completion of the reaction, the desired compound of the alcoholysis reaction can be isolated from the reaction mixture by a conventional method known to the person skilled in the art. For example, the reaction mixture can be condensed

using an ultrafiltration membrane, water added and then the mixture further condensed two or more additional times using an ultrafiltration membrane to remove excess alcohol, and then the obtained condensate is freeze-dried to obtain the target compound. Alternatively, the desired compound can be used as a solution without isolation thereof where it is to be used for modification of proteins.

The desired compound thus obtained, if necessary, can be further purified by a conventional technique such as, for example, a gel filtration column. To obtain a compound having a particular desired average degree of polymerization or desired molecular weight, the purified compound may be further fractionated using gel filtration chromatography.

It should be noted that the target compound of the alcoholysis reaction can contain structural units of formula (II) wherein R^3 is a hydroxy group as a result of the hydrolysis of some units of formula (III) in the starting material by water present in the solvent or the reagent. It should also be noted that a base may be added to the target compound for improved storage.

Where the desired copolymer of the present invention is a pharmacologically acceptable salt, the method for preparing said salt is not particularly limited as long as it is a method commonly employed in the field. For example, a pharmacologically acceptable salt can be obtained by dissolving the copolymer of the invention in an organic solvent, adding a base to the solution thus obtained and then collecting the resultant salt that is precipitated.

A variety of tactics can be employed to control the average molecular weight, the extent of the alternating arrangement and the composition ratio of the copolymers of the present invention.

It is well known that maleic anhydride monomers tend to polymerize alternately with co-monomers including polyoxyethylene allyl methyl diether [e.g. see Comprehensive Polymer Science Vol 4, Chain polymerization Part II, Ed. by G. C. Eastmond et al, pp.377-422, Pergamon Press (1989), T. Yoshimoto et al, Biochemical Biophysical Research Communication Vol 148, 876-882 (1987)]. The

average molecular weight and arrangement of polymers can be controlled by those skilled in the art (e.g. see T Ohtsu and M. Kinoshita, Koubunshi Gousei no Jikkenhou pp 125-154, Kagaku-Dojin 1972) In addition, although maleic anhydride tends to polymerize alternately with co-monomers, the possibility of greater than 50 mol% of the composition ratio being comprised of maleic anhydride units in the co-polymer is well known to those skilled in the art (Japanese Patent No 2621308, No.2701295, No 2803265, No.3271265, No.3035675 and No 3106265, and Japanese Patent Application Publication No 2003-105003 and No 2003-105040).

Generally, to obtain polymers with a higher molecular weight and a greater degree of alternating arrangement, the polymerization should be carried out under mild conditions, such as lower temperature and lower initiator concentration. Higher monomer concentration and lower solvent concentration that reduce the relative concentration of initiator also result in a higher molecular weight and a higher degree of alternating arrangement.

Alternatively, to obtain polymers with a lower molecular weight and a lower degree of alternating arrangement, higher temperature, higher initiator concentration, lower monomer concentration and higher solvent concentration are favorable. Also, under such relatively severe polymerization conditions and/or with more than 50 mol% of the total monomers in the monomer mixture being maleic anhydride, the composition ratio of maleic anhydride units in the resulting co-polymer can be more than 50 mol%.

Some examples of polymerization conditions for polyoxyethylene allyl methyl diether and maleic anhydride are described in T. Yoshimoto et al., Biochemical Biophysical Research Communication Vol 148, 876-882 (1987). According to this paper, polyoxyethylene allyl methyl diether, maleic anhydride, toluene and benzoyl peroxide (initiator) were mixed and polymerization was performed by refluxing at 80 °C for 7 hours. The resulting polymer had a molecular weight of 13kD, and possessed 8 PEG chains and 8 maleic anhydride units. An alternating arrangement of the co-polymer was suggested from the fact that it has a composition ratio of 1:1 and that maleic anhydride monomers tends to copolymerize

alternately with the co-monomers. If a copolymer having a lower molecular weight and lower extent of alternating arrangement are needed, then a higher initiator concentration, lower monomer concentration and/or higher solvent concentration should be applied. For example, when toluene is used as the solvent in
5 polymerisation and the polymerisation is performed at 1 atmosphere, the polymerisation can be performed up to its boiling point of 110 °C. Also, a higher temperature with a different solvent whose boiling temperature is higher than toluene is preferred. In such instances, the kind of initiator needs to be suitably selected because each initiator has a different specific decomposition rate constant and some
10 initiators would decompose at these higher temperatures. Numerous initiators with different decomposition rates are already known in the art [e.g. see Polymer Handbook, Third Edition, pp. II/1-II/65, Ed. by J. Brandrup and E. Immergut, John Wiley & Sons (1989)]

15 Alternative solvents, initiators and reaction conditions to vary the composition ratio, molecular weight and degree of alternating arrangement in copolymerisation reactions of polyoxyethylene allyl methyl diether and maleic anhydride are also disclosed in other prior art documents such as Japanese Patent Application Publication No. 2003-105003. Xylene, for example has a higher boiling
20 point at 1 atmosphere (140 °C) than toluene. It is also known that the copolymerisation reactions can be performed without any solvent in some instances which removes the solvent boiling point limitation on the polymerisation temperature. Various alternative initiators such as benzoyl peroxide, di-tert-butylperoxide and tert-butylperoxyisobutyrate and azo initiators such as azobisisobutyronitrile are also
25 disclosed. It is also possible to decrease the average molecular weight of the copolymer by the use of chain transfer reagents.

If a composition ratio of maleic anhydride units to the total monomer units in the co-polymer of greater than 50% is required, an increased percentage of maleic
30 anhydride monomers in the monomer mixture with or without such relatively severe polymerization conditions should be applied.

Where a pharmaceutically active ingredient is being prepared using a copolymer of the present invention or a pharmacologically acceptable salt thereof and

a protein or an analogue or variant thereof, the ratio of the copolymer to the protein or an analogue or variant thereof is not specifically limited as long as the resulting complex has the desired pharmaceutical activity. Typically, the weight ratio of the copolymer of the present invention or a pharmacologically acceptable salt thereof to the protein or an analogue or variant thereof is from 0.01 to 100:1, preferably it is from 0.1 to 50:1, yet more preferably it is from 1 to 10:1, and most preferably it is from 1 to 1.5:1.

In practical use, a pharmaceutically active ingredient comprising the copolymer of the present invention or a pharmacologically acceptable salt thereof and a protein or an analogue or variant thereof is typically prepared in the form of a protein solution containing the copolymer or a freeze-dried one containing the copolymer of the present invention or a pharmacologically acceptable salt thereof and the protein or an analogue or variant thereof. In the latter case, the freeze-dried form of the active ingredient is dissolved just before it is to be used. Alternatively, the pharmaceutically active ingredient may be prepared in the form of a kit. In this case, the copolymer of the present invention or a pharmacologically acceptable salt thereof and a protein or an analogue or variant thereof are stored in different containers and then mixed to prepare the desired pharmaceutically active ingredient just before use. Of these different forms, the freeze-dried form is most preferred.

Where the copolymer of the present invention or a pharmacologically acceptable salt thereof is used as a protein modifier, the ratio of the copolymer or pharmacologically acceptable salt thereof with respect to the protein or an analogue or variant thereof is not particularly limited to any specific value as long as the desired protein modification is achieved. Typically, the weight ratio of the copolymer of the present invention or a pharmacologically acceptable salt thereof to the protein or an analogue or variant thereof is 0.01 to 100:1, preferably it is from 0.1 to 50:1, yet more preferably it is from 1 to 10:1, and most preferably it is from 1 to 1.5:1.

Where the copolymer of the present invention is used as a protein modifier, the method for modifying the protein is not particularly limited as long as it is a method commonly employed for modifying a protein. For example, a protein or an analogue or variant thereof may be modified as follows

The solvent to be used in the modification process is an aqueous solution containing an electrolyte which is commonly used for dissolving a protein and the pH thereof is not limited to any specific value as long as it lies in a range where the protein modifier can be negatively charged as a result of the dissociation of at least some of the carboxyl groups in the protein modifier of the present invention and the protein or an analogue or variant thereof can be positively charged. For example, the pH can be set to a value in the range of from 3 to the isoelectric point of the protein or an analogue or variant thereof, and preferably it is set to a value in the range of from 4 to 8. In this regard, it should be noted that the isoelectric point of the protein or an analogue or variant thereof can be determined by electrophoresis.

The protein modifier is dissolved in the above-described solvent and then the thus obtained solution is added to an aqueous solution of said protein or an analogue or variant thereof. The obtained solution may be shaken to facilitate reaction if necessary. The pH of the resulting mixture may be adjusted if desired by the addition of an acid and/or a base. The ratio of the protein modifier of the present invention to be used with respect to said protein or an analogue or variant thereof is not limited to any specific value as long as it gives the desired modification to the protein. Typically, the ratio is in the range of from 0.01 to 100 by weight, preferably in the range of from 0.1 to 50, more preferably in the range of from 1 to 10; and most preferably it is from 1 to 1.5.

The reaction temperature for the modification process varies depending on the compound used and the reagent but is usually in the range of from 0 to 100°C, preferably in the range of from 4 to 40°C and most preferably in the range of from 30 to 40°C.

The reaction time varies depending on the reaction temperature, the compound used, the reagent and the kind of solvent used, but is usually in the range of from 5 minutes to 14 days, preferably in the range of from 1 hour to 12 days, and more preferably in the range of from 5 days to 10 days.

Sometimes, during the protein modification process the conditions used are such that some of the structural units of formula (II) in the copolymer are converted to units of formula (II) having a different identity. For example, where R^3 in the structural units of formula (II) is a group other than a hydroxy group, the conditions used for the modification process are such that some of said R^3 groups are hydrolysed to give structural units of formula (II) wherein R^3 is a hydroxy group

As noted above, the complexes of the present invention comprise at least one protein or an analogue or variant thereof which is bound to at least one copolymer of the present invention or a pharmacologically acceptable salt thereof. In said complex, the protein or an analogue or variant thereof and copolymer or a pharmacologically acceptable salt thereof are bound to each other by a chemical bond such as a covalent bond (e.g. Schiff base formation, amide bond formation and ester bond formation), an ionic bond or a coordinate bond, or by a non-chemical bond such as a hydrophobic interaction, a hydrogen bond, an electrostatic interaction or affinity binding.

Preferably, the complexes of the present invention are not detected in dissociated form to any significant extent when subjected to size exclusion chromatography or SDS-PAGE under non-reducing conditions. More preferably, the complexes of the present invention are not detected in dissociated form to any significant extent when subjected to size exclusion chromatography and SDS-PAGE under non-reducing conditions. Yet more preferably, additionally the rate of failure to detect the protein of the complex by ELISA of the complexes of the present invention as a result of modification of the protein structure by the copolymers and pharmacologically acceptable salts thereof is very low (preferably, the rate of failure is 20% or less, more preferably 15% or less and most preferably 10% or less)

In the present invention, a protein analogue is defined as a protein encoded by cDNA cloned from a cDNA library derived from animal cells, body fluids or tissues by hybridization using cDNA of the protein under stringent conditions (60 to 70°C, 6×SSC)

In the present invention, a protein variant is defined as a protein which is obtained by substituting, deleting, adding or inserting one or more amino acids in the original protein and still has at least a part of the activity of the original protein at a detectable level

5

Preferably, the protein or an analogue or variant thereof is a basic protein. More preferably, the basic protein is a basic fibroblast growth factor (bFGF), an epidermal growth factor (EGF), an osteoclastogenesis inhibitory factor (OCIF), a platelet-derived growth factor (PDGF), a brain-derived neurotrophic factor (BDNF), a nerve growth factor (NGF), a human growth hormone (HGH), a hepatocyte growth factor (HGF), or a vascular endothelial growth factor (VEGF), or an analogue or a variant thereof. Most preferably, the basic protein is an osteoclastogenesis inhibitory factor (OCIF) or an analogue or a variant thereof

10

15

OCIF, an analogue thereof or a variant thereof used in the present invention can be natural type or it can be recombinant type and its origin is not particularly limited. Natural type OCIF means OCIF that is obtained as a naturally produced protein by extraction, purification and/or isolation from an organ, a body fluid, a cell culture, or a culture medium derived from a human or a non-human animal. Recombinant type OCIF, an analogue thereof or a variant thereof is a recombinant protein obtained by extraction, purification and/or isolation of said protein from a host conventionally used in such techniques such as a prokaryotic host cell (e.g. *Escherichia coli*) or a eukaryotic cell such as a human or a non-human cell line which has been transformed with a vector comprising a polynucleotide which encodes an OCIF, an analogue thereof or a variant thereof [e.g. see the recombinant methods disclosed in EP-A-0816380 (WO-A-96/26217) and WO-A-97/23614]

20

25

30

The origin of the OCIF, analogues thereof and variants thereof used in the present invention is not particularly limited and they can be derived from a human or a non-human animal. Preferably, they can be derived from a mammal such as a human, rat, mouse, rabbit, dog, cat, cow, swine, sheep or goat, or an avian such as a fowl, goose, chicken or turkey. More preferably, they are derived from mammals and most preferably they are derived from a human.

The OCIF or analogue thereof used in the present invention can be a monomer-type OCIF (e.g. in humans a monomer having a molecular weight as measured by SDS-PAGE under non-reducing conditions of about 60000) or a dimer type (e.g. in humans a dimer having a molecular weight of about 120000 as measured by SDS-PAGE under non-reducing conditions) [see EP-A-0816380 (WO-A-96/26217)] It is preferably a monomer of human OCIF having a molecular weight of about 60,000 as measured by SDS-PAGE under non-reducing conditions or a dimer of human OCIF having a molecular weight of about 120,000 as measured by SDS-PAGE under non-reducing conditions, and is more preferably a dimer of human OCIF having a molecular weight of about 120,000 as measured by SDS-PAGE under non-reducing conditions

It is known that OCIF is translated in cells as a polypeptide containing a signal peptide at the amino terminus thereof and that it is then matured by processing involving the removal of said signal peptide [e.g. see the recombinant methods disclosed in EP-A-0816380 (WO-A-96/26217) and WO-A-97/23614] The OCIF, analogue thereof or variant thereof used in the present invention includes both the polypeptide containing a signal peptide and the matured form thereof. Preferred examples include the human OCIF with the signal peptide having amino acids -21 to +380 of SEQ ID NO 1 of the sequence listing and the mature human OCIF without the signal peptide having amino acids +1 to +380 of SEQ ID NO 1 of the sequence listing. Of these, the mature human OCIF is particularly preferred

It is also known that methionine can be added to such a matured form of OCIF, an analogue thereof or a variant thereof, when it is expressed as a recombinant protein in a host cell, especially in a prokaryotic host cell such as *Escherichia coli*. This is achieved by adding a nucleotide triplet having the sequence ATG (AUG) to the 5'-end of a polynucleotide encoding a matured form of OCIF, an analogue thereof or a variant thereof, and inserting the resultant polynucleotide into a suitable expression vector. The desired matured protein having methionine at the amino terminus thereof can be then expressed by a suitable host cell which has been transformed by said recombinant expression vector. Additionally, one or more than one amino acid can be added to said protein at a position next to the amino terminal methionine by the addition of further nucleotide triplets next to the ATG triplet added at the 5'-end of the

polynucleotide encoding a matured form of OCIF, an analogue thereof or a variant thereof. The target matured form of OCIF, an analogue thereof, or a variant thereof having methionine at the amino terminus can be purified and isolated from a culture of the transformed host cell according to a conventional method. In addition, one or more amino acids may be inserted into the matured form of OCIF having methionine at the amino terminus, an analogue thereof or a variant thereof at a position adjacent to the methionine and closer to the carboxy terminus than the methionine.

In the present invention, an OCIF analogue means a protein encoded by a polynucleotide which exists naturally in the cells, body fluid, and/or organs of a human or non-human animal such as those exemplified above. Specific preferred examples of such analogues include OCIF2, OCIF3, OCIF4 and OCIF5 [see EP-A-0816380 (WO96/26217)]. Such OCIF analogues or active fragments thereof can be obtained by a method such as the following. RNA is extracted from a cell, organ, tissue or body fluid of a human or non-human animal, a first strand of cDNA which is complementary to said RNA is synthesized using a reverse transcriptase, and then a second strand of said cDNA is synthesized using the first as a template using a DNA polymerase; the double-stranded cDNA thus-obtained is inserted into a suitable, conventionally-used expression vector; a suitable, conventionally-used host cell is then transformed by the vector thus-obtained, the host producing the desired peptide is then screened for using a hybridization technique such as plaque hybridization or phage hybridization using OCIF cDNA or a fragment thereof as a probe under stringent conditions [see EP-A-0816380 (WO-A-96/26217)], and then finally the desired OCIF analogue is expressed by a conventional technique by the thus-obtained host cell.

In the present invention, an OCIF variant means a protein which has an amino acid sequence wherein one or more than one amino acid residues have been substituted in, deleted from, added to or inserted in the amino acid sequence of an OCIF or an analogue thereof, and still has at least some OCIF activity. Such OCIF variants can be obtained by, for example, the following method: substituting, deleting, adding and/or inserting one nucleotide or more than one nucleotides in a nucleotide sequence encoding OCIF or an analogue thereof using a polymerase chain reaction method (referred to hereinafter as PCR), a genetic recombination method or a

42

nuclease digestion method using an exonuclease or endonuclease such as a restriction enzyme, transforming a eukaryotic host cell such as an animal cell or a prokaryotic host cell such as *Escherichia coli* with an expression vector wherein the obtained nucleotide encoding the desired OCIF variant has been inserted, and then extracting, purifying and/or isolating the desired peptide from the protein-containing fraction produced by a cell culture of said transformed host according to a method well-known to the person skilled in the art

Truncated forms of OCIF wherein a considerable part of the amino acid sequence has been deleted from the carboxy terminus of an OCIF polypeptide are also known to keep at least some OCIF activity [e.g. see EP-A-0816380 (WO-A-96/26217) and WO-A-97/23614] Such truncated types of OCIF retaining at least some of the activity of the complete OCIF polypeptide are also included in the OCIF variants of the present invention.

Furthermore, OCIF or a truncated form thereof that is fused with the an immunoglobulin domain such as the Fc domain (e.g. a fusion polypeptide in which the Fc domain of human IgG is attached to the carboxy terminus of OCIF) and which retains at least some of the activity of the complete OCIF polypeptide is known (see WO-A-97/23614), and such fusion proteins are also included in the OCIF variants of the present invention.

Any naturally-produced OCIF or an analogue thereof or recombinant OCIF or analogue or variant thereof can contain a sugar chain which is attached to the OCIF or analogue or variant thereof post-translationally. Naturally-produced OCIF or an analogue thereof containing a sugar chain can be obtained from cell cultures, tissues, organs, body fluids or cell lines derived from human or non-human animals using conventional techniques. Recombinant OCIF or an analogue or variant thereof containing a sugar chain can be obtained from a culture of a eukaryotic host cell transformed using a vector comprising a nucleotide sequence encoding any OCIF or an analogue or variant thereof such as those described and exemplified above. Examples of suitable host cells that can be used which are capable of the post-translational modification of OCIF or an analogue or variant thereof so as to attach a sugar chain include chinese hamster ovary cells and COS cells [Yasuda, H. et al,

Endocrinology, 139, 1329-1337 (1998)] OCIF or an analogue or variant thereof containing such a sugar chain is suitable for use in the formation of the complexes of the present invention. The sugar chain in OCIF or an analogue or variant thereof containing a sugar chain can be artificially modified (in particular, enzymatically) with polymers, polysaccharides or modified polysaccharides

The pharmaceutical composition of the present invention which contains a copolymer of the present invention or a pharmacologically acceptable salt thereof and a protein or an analogue thereof may be a solution prepared according to a method described above or one obtained by freeze-drying the solution. Alternatively, such a pharmaceutical composition may be formulated according to an alternative method or it may be in the form of a kit. In the latter case, the copolymer of the present invention or a pharmacologically acceptable salt thereof and a protein or an analogue or variant thereof are stored in different containers and then mixed to prepare the desired pharmaceutically composition just before use.

The pharmaceutical compositions of the present invention may optionally further comprise a base. The base is not limited to any specific base as long as it is a base commonly used in pharmaceutical compositions. Examples of such a base include inorganic bases such as alkali metal carbonates (e.g. sodium carbonate, potassium carbonate and lithium carbonate), alkali metal hydrogencarbonates (e.g. sodium hydrogencarbonate, potassium hydrogencarbonate and lithium hydrogencarbonate), alkali metal hydrides (e.g. lithium hydride, sodium hydride, and potassium hydride), alkali metal hydroxides (e.g. sodium hydroxide, potassium hydroxide, barium hydroxide and lithium hydroxide), alkali metal fluorides (e.g. sodium fluoride and potassium fluoride), and organic bases such as alkali metal alkoxides (e.g. sodium methoxide, sodium ethoxide, potassium methoxide, potassium ethoxide, potassium t-butoxide and lithium methoxide), alkali metal mercaptans (e.g. sodium methyl mercaptan and sodium ethyl mercaptan), N-methylmorpholine, triethylamine, tripropylamine, tributylamine, diisopropylethylamine, dicyclohexylamine, N-methylpiperidine, pyridine, 4-pyrrolidinopyridine, picoline, 4-(N,N-dimethylamino)pyridine, 2,6-di(t-butyl)-4-methylpyridine, quinoline, N,N-dimethylaniline, N,N-diethylaniline, 1,5-diazabicyclo[4.3.0]non-5-ene (DBN), 1,4-diazabicyclo[2.2.2]octane (DABCO) and 1,8-diazabicyclo[5.4.0]undec-7-ene (DBU)

Of these bases, alkali metal hydroxides are preferred and sodium hydroxide is particularly preferred. In this regard, it is to be noted that a part or all of the bases may form salts with the copolymer of the present invention

5 Examples of the pharmaceutical composition according to the present invention comprise a complex of at least one substance selected from a copolymer of the present invention or a pharmacologically acceptable salt thereof and a protein or an analogue or variant thereof selected from bFGF (used for the treatment or prevention of ischemic arteriopathic disease and intractable skin ulcers), EGF (used
10 for the treatment or prevention of ulcerous diseases such as ulcerative colitis and prolonged corneal epithelial disorder), PDGF (used for the treatment of wounds), BDNF and NGF (used for the treatment or prevention of diseases of the central nervous system such as Parkinson's Disease and Alzheimer's Disease), HGH (used for the treatment or prevention of growth hormone deficiency, growth hormone
15 hyposecretion syndrome, Turner's syndrome and cartilage dystrophy), HGF (used for the treatment or prevention of diabetes mellitus, arteriosclerosis such as brain infarction and hepatitis fibrosis) and VEGF (ischemic arteriopathic disease and peripheral arterial occlusive disease)

20 One particularly preferred example of the pharmaceutical composition according to the present invention comprises a complex of at least one substance selected from OCIF, an analogue and a variant thereof and at least one substance selected from a copolymer of the present invention or a pharmacologically acceptable salt thereof. Such a pharmaceutical composition is particularly suitable for the
25 prevention or treatment of bone metabolic diseases. In the present invention, such bone metabolic diseases include any diseases which are characterized by substantial bone mass reduction in the patient suffering therefrom and in which it is necessary to suppress bone resorption or the rate of bone resorption in order to prevent or treat said diseases

30

Bone metabolic diseases which can be treated or prevented using the pharmaceutical composition of the present invention include primary osteoporosis (senile osteoporosis, postmenopausal osteoporosis, and idiopathic juvenile osteoporosis), endocrine osteoporosis (hyperthyroidism, hyperparathyroidism,

Cushing's syndrome, and acromegaly), osteoporosis accompanying hypogonadism (hypopituitarism, Klinefelter syndrome, and Turner syndrome), hereditary and congenital osteoporosis (osteogenesis imperfecta, homocystinuria, Menkes syndrome, and Riley-Day syndrome), osteopenia due to gravity load mitigation or fixation and immobilization of limbs, Paget's disease, osteomyelitis, infectious focus due to loss of bone, hypercalcemia resulting from solid carcinoma (breast carcinoma, lung cancer, kidney cancer, and prostatic cancer), hematological malignant diseases (multiple myeloma, lymphoma, and leukemia), idiopathic hypercalcemia, hypercalcemia accompanying hyperthyroidism or kidney malfunction, osteopenia resulting from steroid medication, osteopenia resulting from administration of other medicines (e.g., immunosuppressive agents such as methotrexate and cyclosporine A, heparin, and antiepileptics), osteopenia accompanying kidney malfunction, osteopenia accompanying a surgical operation or digestive organ diseases (e.g., small intestine hindrance, large intestine hindrance, chronic hepatitis, gastrectomy, primary biliary liver cirrhosis, and liver cirrhosis), osteopenia due to various types of rheumatism such as rheumatoid arthritis, osteoclasts and joint destruction due to various types of rheumatism such as rheumatoid arthritis, mutilans type rheumatoid arthritis, osteoarthritis, loss of periodontal bone, cancer metastasis to bone (osteolysis metastasis); osteonecrosis or osteocyte death accompanying traumatic injury, Gaucher's disease, sickle-cell anemia, systemic lupus erythematosus, or nontraumatic injury, osteodystrophy such as renal osteodystrophy; osteopenia accompanying hypophosphatasia or diabetes, osteopenia accompanying nutritional disorder or eating disorder; and other osteopenia. Further, in the present invention, cachexia due to the above-mentioned solid carcinoma, cancer metastasis to bone (osteolysis metastasis) or hematological malignant diseases is also included in bone metabolic diseases (see Japanese Patent Application (Kokai) No. 2000-178200)

The pharmaceutical composition according to the present invention as described above can be safely administered orally or non-orally to a human or animals other than a human. The dosage form of the pharmaceutical composition may be appropriately selected depending on the kind of disease, the level of the disease and the condition, age, sex and weight of the patient. For example, the pharmaceutical composition may be orally administered in the form of tablets, capsules, powders, granules or syrups, injected in the form of an injection intravenously alone or in

combination with a common adjunct such as glucose, amino acids or the like, or injected intramuscularly, subcutaneously, intracutaneously or intraperitoneally alone, administered transdermally in the form of cataplasm, administered transnasally in the form of nasal drops, administered transmucosally or to the oral cavity in the form of a transmucosal preparation, or administered intrarectally in the form of a suppository. These preparations can be formulated in a conventional manner using well-known auxiliary agents which are generally used in the field of medicine such as excipients, binding agents, disintegrants, lubricants, flavoring agents, solubilizers, suspending agents, colorants, pH regulators, antiseptics, gelling agents, surfactants and coating agents.

Where the pharmaceutical composition is prepared in the form of a tablet, various carriers known in the art can be used. Examples of such carriers include excipients such as lactose, sucrose, sodium chloride, glucose, urea, starch, calcium carbonate, kaolin, crystalline cellulose and silicic acid, binding agents such as water, ethanol, propanol, simple syrup, glucose solution, starch solution, gelatin solution, carboxymethyl cellulose, shellac, methyl cellulose, potassium phosphate and polyvinyl pyrrolidone, disintegrants such as dry starch, sodium alginate, agar powder, laminaran powder, sodium hydrogencarbonate, calcium carbonate, polyoxyethylene sorbitan fatty acid esters, sodium lauryl sulfate, stearic acid monoglyceride, starch and lactose, disintegration inhibitors such as sucrose, stearin, cacao butter and hydrogenated oil, absorption accelerators such as quaternary ammonium bases and sodium lauryl sulfate, moisturizers such as glycerin and starch, absorbents such as starch, lactose, kaolin, bentonite and colloidal silicic acid, and lubricants such as purified talc, stearates, boric acid powder and polyethylene glycol. In addition, such a tablet may be covered with a conventional coating, if necessary. Examples of such a coated tablet include a sugar-coated tablet, a gelatin-coated tablet, an enteric coated tablet, a film-coated tablet, a double-layered tablet and a multi-layered tablet.

Where the pharmaceutical composition is prepared in the form of a pill, various carriers known in the art can be used. Examples of such carriers include excipients such as glucose, lactose, cacao butter, starch, hydrogenated vegetable oil, kaolin and talc, binding agents such as gum Arabic powder, tragacanth powder, gelatin and ethanol, and disintegrants such as laminaran agar.

Where the pharmaceutical composition is prepared in the form of a suppository, various carriers known in the art can be used. Examples of such carriers include polyethylene glycol, cacao butter, higher alcohols, esters of higher alcohols, gelatin and semi-synthetic glycerides

Where the pharmaceutical composition is prepared in the form of an injection, it is preferred that the composition in the form of a solution or a suspension is sterilized and is made isotonic with blood. When such a composition in the form of a solution, an emulsion, a suspension or a substantially homogenous aqueous solution is prepared, various diluents known in the art can be used. Examples of such diluents include water, ethanol, propylene glycol, ethoxylated isostearyl alcohol, polyoxylated isostearyl alcohol and polyoxyethylene sorbitan fatty acid esters. In this case, the pharmaceutical composition may further contain common salt, glucose or glycerin in an amount sufficient to maintain isotonicity with blood. Further, the pharmaceutical composition may also contain conventional solubilizers, buffering agents, smoothing agents, pH regulators, stabilizers or solubilizing agents. Such an injection may be freeze-dried.

Additionally, the pharmaceutical composition of the present invention may also contain colorants, preservatives, perfumes, flavoring agents, sweeteners or other medicine if required

The amount of the complex of OCIF or an analogue or variant thereof and copolymer or a pharmacologically acceptable salt thereof contained in the pharmaceutical composition of the present invention is not limited to any specific value, but it is usually in the range of from 0.1 to 70 wt%, and preferably in the range of from 1 to 30 wt%

In the present invention, the dose of the complex of OCIF or an analogue or variant thereof and copolymer or a pharmacologically acceptable salt thereof contained in the pharmaceutical composition of the present invention depends on various factors including the condition and age of the patient, the route of administration and the form of the drug. In general, the amount administered to an

adult human per administration is in a range between the upper limit of 1 to 50 mg/kg and a lower limit of 0.001 to 0.1 mg/kg, wherein the range of from 0.01 to 1 mg/kg is preferable, and the range of from 0.1 to 1 mg/kg is more preferable.

5 The pharmaceutical composition according to the present invention should be administered once per several months, once per month, once per several days, once per day or several times per day depending on the kind of ingredient contained in the pharmaceutical composition, the route of administration and the form of the drug. When the composition comprises a complex of OCIF or an analogue or variant thereof and a copolymer or a pharmacologically acceptable salt thereof for use as an agent for the treatment or prevention of bone metabolic diseases according to the present invention it should be administered once per several months, once per month, once per several days, once per day or several times per day depending on the kind of active ingredient contained in the agent for the treatment or prevention of bone metabolic diseases, the route of administration and the form of the drug.

10

15

 The copolymer of the present invention and pharmacologically acceptable salts thereof are useful as a polymeric modifier capable of providing a complex having uniform properties, especially reduced production of disorganised cross-linked structures with the protein, better maintenance of protein activity and excellent retention of the protein in the blood after administration of said complex. This makes it particularly useful as a modifier for modifying the pharmaceutical properties of proteins having useful pharmaceutical activity.

20

Examples

The following examples, reference examples and test examples are intended to further illustrate the present invention and are not intended to limit the scope of the invention in any way. In the following examples, m and R^3 are as defined above for formulae (I) and (II), "comp. ratio" is the composition ratio [i.e. the ratio of the structural units (I) and (II)], "av. deg. pol." is the average degree of polymerization of the copolymer prepared and "hyd. ratio" is the hydrolysis ratio of the copolymer prepared [i.e. the average ratio of the structural units wherein R^3 is $-OH$ to the structural units wherein R^3 is other than $-OH$].

Example 1

Preparation of poly(PEG₃₀₀-MA) hydrolysate [poly(PEG₃₀₀-MA)h] wherein $m=6-16$, $R^3=OH$, comp. ratio= about 1:1, av. deg. pol.=30-40 and hyd. ratio= about 10:0 (Compound No. 1)

A copolymer of polyoxyethylene allyl methyl diether ($m = 6-16$, Alk = ethylene, $R^1 =$ hydrogen and $R^2 =$ methyl) and maleic anhydride, in which the polyoxyethylene side chain has an average molecular weight of about 500 and the average degree of polymerization of the main chain is in the range of from 30 to 40, [AM-0530K, manufactured by NOF Corporation (hereinafter referred to as "poly(PEG₃₀₀-MA)"] was used as the starting material. 50 ml of distilled water were added to 3 g of poly(PEG₃₀₀-MA) to dissolve said starting material, and the solution thus obtained was stirred at 40°C for 15 hours. The resulting solution was condensed using an ultrafiltration membrane made of polyethersulfone (having a molecular weight cut-off of 10,000, manufactured by Millipore Corporation, model number PBGC07610), and the resulting condensate was freeze-dried to obtain 1.3 g of the title compound poly(PEG₃₀₀-MA)h (Compound No. 1) as an oily compound.

Poly(PEG₃₀₀-MA)h (Compound No. 1) was purified using gel filtration as follows. 100 mg of poly(PEG₃₀₀-MA)h (Compound No. 1) were dissolved in 4 ml of 0.001 N sodium hydroxide solution. The solution was divided into four batches and each 1 ml batch was applied to a gel filtration column (PD-10, manufactured by

46

Amersham-Pharmacia) The first 1 ml of eluant was discarded. 1.5 ml of 0.001 N sodium hydroxide solution were then applied to each column and a further 1.5 ml were eluted from the column and discarded. 2.5 ml of 0.001 N sodium hydroxide solution were then applied to each column and a further 2.5 ml were eluted from the column and it is this fraction that contained the purified poly(PEG₃₀₀-MA)_n (Compound No. 1). The purified fractions from the four columns were combined to give 10 ml of a purified solution of the title compound. The yield after the purification step (determined spectrophotometrically by measuring the absorbance of poly(PEG₃₀₀-MA)_n at 210 nm before and after purification) was determined to be 80% (80 mg of polymer) and the concentration in the purified solution was determined to be 8 mg/ml.

The carboxyl group content of the title compound was determined by conductometric titration as follows. 7.5 ml of the solution of the purified title compound obtained above (containing 60 mg of the title compound) were made up to a volume of 50 ml with distilled water and the solution thus obtained was adjusted to pH 12 with 1M aqueous sodium hydroxide solution. 0.1M hydrochloric acid was added to the solution in increments of 0.1 ml, the pH and conductivity of the solution being measured after each addition of hydrochloric acid. The carboxyl group content of the copolymer was then calculated from the amount of 0.1M hydrochloric acid added in the conductivity buffering region (i.e. the region of the plot of conductivity against amount of hydrochloric acid added in which the carboxyl groups of the copolymer of the title compound act as a buffer, said region corresponding to a pH range of about 10.5 to 3), the molar amount of hydrochloric acid used in the conductivity buffering region is equal to the molar amount of carboxyl groups on the copolymer of the title compound. As a result, the carboxyl group content per 1g of title compound was determined to be 3.22 mmols. From this, the composition ratio was calculated to be 1.107. This figure was applied for the following Examples where the same starting material was used.

30

Example 2

Preparation of poly(PEG₁₅₀₀-MA) hydrolysate [poly(PEG₁₅₀₀-MA)h] wherein
m=28-38, R¹=OH, comp. ratio= about 1.1, av. deg. pol.=10-15
and hyd. ratio= about 10.0 (Compound No. 2)

A copolymer of polyoxyethylene allyl methyl diether (m = 28-38, Alk = ethylene, R¹ = hydrogen and R² = methyl) and maleic anhydride, in which the polyoxyethylene has an average molecular weight of about 1500 and the average degree of polymerization of the main chain is in the range from 10-15, (AM-1510K, manufactured by NOF Corporation) [hereinafter referred to as "poly(PEG₁₅₀₀-MA)"] was used as the starting material. 25 ml of distilled water were added to 1.5 g of poly(PEG₁₅₀₀-MA) to dissolve said starting material, and the solution thus obtained was stirred at room temperature for 20 hours. At the end of this time, the solution was condensed in the same manner as described in Example 1 above using an ultrafiltration membrane made of polyethersulfone (having a molecular weight cut-off of 10,000, manufactured by Millipore Corporation, model number FBG-C07610), and the resulting condensate was freeze-dried to obtain 0.8 g of the title compound poly(PEG₁₅₀₀-MA)h (Compound No. 2) as an oily compound.

The carboxyl group content of the title compound poly(PEG₁₅₀₀-MA)h (Compound No. 2) was measured in the same manner as described in Example 1 above and, as a result, the carboxyl group content per 1 g of the title compound was determined to be 1.63 mmols. From this, the composition ratio was calculated to be 1.14. This figure was applied for the following Examples where the same starting material was used.

Example 3

Preparation of product of ammonolysis of poly(PEG₅₀₀-MA) [poly(PEG₅₀₀-MA)a]
wherein m=6-16, R¹=NH₂, comp. ratio= about 1.1, av. deg. pol.=30-40
and hyd. ratio= about 0.10 (Compound No. 3)

9.5 g of ammonia water (ammonia concentration 28 wt%) were added to 1 g of poly(PEG₅₀₀-MA) (AM-0530K, manufactured by NOF Corporation) to dissolve said starting material, and the solution thus obtained was stirred at room temperature for 16 hours. At the end of this time, the solution thus obtained was subjected to dialysis through a regenerated cellulose membrane (having a molecular weight cut-off

of 12,000 to 14,000, manufactured by Sanko Junyaku Co., Ltd., Model No. UC36-32-100) against 1 litre of a 0.1 wt% aqueous acetic acid solution for one day, and was then further subjected to dialysis against 1 litre of water for 1 day. After 1 litre of water was renewed, it was further subjected to dialysis for another one day. By carrying out such dialysis, excess ammonia was eliminated from the product. The solution thus obtained was condensed using an ultrafiltration membrane made of polyethersulfone (having a molecular weight cut-off of 10,000, and manufactured by Millipore Corporation, model number PBGC07610), and the resulting condensate was freeze-dried to obtain 0.99 g of the title compound poly(PEG₃₀₀-MA)_a (Compound No. 3) as an oily compound.

The carboxyl group content in 1 g of poly(PEG₃₀₀-MA)_a (Compound No. 3) was determined by conductometric titration in the same manner as described in Example 1 above and, as a result, the carboxyl group content per 1 g of the title compound was determined to be 1.55 mmols.

Under the reaction conditions used, it is possible that the maleic anhydride residue could be subjected not only to a ring-opening reaction due to ammonolysis but also hydrolysis by water present in the reaction system. The ratio of the maleic anhydride residues subjected to ammonolysis to the maleic anhydride residues subjected to hydrolysis was calculated as follows.

In Example 1, the carboxyl group content in 1 g of poly(PEG₃₀₀-MA)_h (Compound No. 1) was determined. This gives the figure for carboxyl group content when all maleic acid residues are fully hydrolysed (3.22 mmols per 1 g of polymer). From this result, the weight of poly(PEG₃₀₀-MA)_h (Compound No. 1) per mol of carboxyl group ($1/3 \times 22 \times 10^{-3}$ g) and the weight of poly(PEG₃₀₀-MA)_h (Compound No. 1) per mol of ring-opened maleic acid residue [2 x the weight of poly(PEG₃₀₀-MA)_h (Compound No. 1) per mol of ring-opened maleic acid residue, since there are 2 carboxyl groups per fully hydrolysed maleic acid residue] were determined by calculation, giving the results 311 g and 621 g, respectively. From these values, the weight of poly(PEG₃₀₀-MA) (that is, the weight of the copolymer before hydrolysis) per gram of functional group, and the weight of poly(PEG₃₀₀-MA)_a (Compound No. 3) obtained by adding ammonia to poly(PEG₃₀₀-MA) per gram of functional group

were determined. Specifically, the weight of poly(PEG₃₀₀-MA) (that is, the weight of the copolymer before hydrolysis) per mol of maleic anhydride residue was obtained by subtracting the molecular weight of a molecule of water (18 g) from the weight of the fully hydrolysed copolymer, giving a figure of 603 g. The weight of poly(PEG₃₀₀-MA)a (Compound No. 3) per mol of carboxyl group was obtained by adding the molecular weight of a molecule of ammonia (17 g) to the weight of poly(PEG₃₀₀-MA), giving a figure of 620 g. From this value, the theoretical carboxyl group content per 1 g of poly(PEG₃₀₀-MA)a (Compound No. 3) where all maleic anhydride residues have been subjected to ammonolysis (i.e. no hydrolysis) was determined by calculation (1 g/620), and was found to be 1.61 mmols. From the carboxyl group content per 1 g of poly(PEG₃₀₀-MA)b (Compound No. 1), where all maleic anhydride residues were subjected to hydrolysis, the theoretical carboxyl group content per 1 g of poly(PEG₃₀₀-MA)a (Compound No. 3) where all maleic anhydride residues have been subjected to ammonolysis, and the actual carboxyl group content per 1 g of poly(PEG₃₀₀-MA)a (Compound No. 3) measured above (i.e. 1.55 mmols), the ratio of maleic anhydride residues subjected to ammonolysis in the title compound to the total number of maleic anhydride residues in the starting material was calculated, and was determined to be 1.0. Thus, it was confirmed that substantially all maleic anhydride residues had been subjected to ammonolysis and that virtually no hydrolysis had taken place.

Example 4

Preparation of reaction product of dimethylamine and poly(PEG₃₀₀-MA)
[poly(PEG₃₀₀-MA)dma)] wherein m=6-16, R³=NMe₂, comp. ratio= about 1.1,
av. deg. pol.=30-40 and hyd. ratio= about 0.10 (Compound No. 4)

71 g of an aqueous dimethylamine solution (dimethylamine concentration 50 wt%) were added to 10 g of poly(PEG₃₀₀-MA) (AM-0530K, manufactured by NOF Corporation) to dissolve it, and the solution thus obtained was stirred at room temperature for 20 hours. At the end of this time, the solution thus obtained was subjected to dialysis through a regenerated cellulose membrane (having a molecular weight cut-off of 12,000 to 14,000, and manufactured by Sanko Junyaku Co., Ltd., Model No. UC36-32-100) against 10 litre of a 0.1 wt% aqueous acetic acid solution for one day, and was then further subjected to dialysis against 10 litre of water for 1 day. After 10 litre of water was renewed, it was further subjected to dialysis for

another one day. By carrying out such dialysis, excess dimethylamine was eliminated from the product. The solution thus obtained was condensed using an ultrafiltration membrane made of polyethersulfone (having a molecular weight cut-off of 10,000, and manufactured by Millipore Corporation, model number PBGC07610), and the resulting condensate was freeze-dried to obtain 6.3 g of the title compound poly(PEG₃₀₀-MA)dma (Compound No. 4) as an oily compound.

The carboxyl group content in 1 g of poly(PEG₃₀₀-MA)dma (Compound No. 4) was determined in the same manner as described in Example 1 above, and was determined to be 1.53 mmols. Using a calculation similar to that in Example 3 for the ammonolysis product, the theoretical carboxyl group content in 1 g of poly(PEG₃₀₀-MA)dma (Compound No. 4) where all maleic anhydride residues have been subjected to aminolysis was determined by calculation, and was determined to be 1.54 mmols. From these results, the ratio of maleic anhydride residues subjected to aminolysis in the title compound to the total number of maleic anhydride residues in the starting material was calculated, and was determined to be 1.0. Thus, it was confirmed that substantially all maleic anhydride residues had been subjected to ammonolysis by dimethylamine and that virtually no hydrolysis had taken place.

20

Example 5

Preparation of reaction product of 1-amino-2-propanol and poly(PEG_m-MA) [poly(PEG_m-MA)(pa)] wherein m=6-16, R¹=NH(CH₂CH(OH)CH₃), comp. ratio= about 1:1, av. deg. pol. ≈30-40 and hyd. ratio= about 0:10 (Compound No. 5)

25

14 g of 1-amino-2-propanol were added to 1.5 g of poly(PEG₃₀₀-MA) (AM-0530K, manufactured by NOF Corporation) to dissolve it, and the solution thus obtained was stirred at room temperature for 16 hours. At the end of this time, 300 ml of distilled water were added to the solution, and glacial acetic acid was further added to neutralize the solution. The solution thus obtained was condensed using an ultrafiltration membrane made of polyethersulfone (having a molecular weight cut-off of 10,000, and manufactured by Millipore Corporation, model number PBGC07610) to obtain 50 ml of condensate. 300 ml of distilled water were added to the condensate, and the resulting solution was again condensed in the same manner. This cycle of diluting the condensate with distilled water followed by re-condensation was repeated

30

five times to eliminate excess 1-amino-2-propanol. The resulting condensate was freeze-dried to obtain 1.3 g of the title compound poly(PEG₃₀₀-MA)ipa (Compound No. 5) as an oily compound.

5 The carboxyl group content in 1 g of poly(PEG₃₀₀-MA)ipa (Compound No. 5) was determined in the same manner as described in Example 1 above, and was determined to be 1.55 mmols. Using a calculation similar to that in Example 3 for the aminolysis product, the theoretical carboxyl group content in 1 g of poly(PEG₃₀₀-MA)ipa (Compound No. 5) where all maleic anhydride residues have been subjected
10 to aminolysis was determined by calculation, and was determined to be 1.47 mmols. From these results, the ratio of maleic anhydride residues subjected to aminolysis in the title compound to the total number of maleic anhydride residues in the starting material was calculated, and was determined to be 1.0. Thus, it was confirmed that substantially all maleic anhydride residues in the starting material had been subjected
15 to aminolysis by 1-amino-2-propanol and that virtually no hydrolysis had taken place.

Example 6

Product of alcoholysis reaction between ethanol and poly(PEG₃₀₀-MA)
[poly(PEG₃₀₀-MA)ea] wherein m=6-16, R¹=OCH₂CH₃, comp. ratio= about 1.1,
20 av. deg. pol.=30-40 and hyd. ratio= about 4:6 (Compound No. 6)

25 g of absolute ethanol were added to 1.5 g of poly(PEG₃₀₀-MA) (AM-0530K, manufactured by NOF Corporation) to dissolve it, and the solution thus obtained was stirred at room temperature for 16 hours. At the end of this time, 300 ml of water
25 were added, and the resulting solution was condensed using an ultrafiltration membrane made of polyethersulfone (having a molecular weight cut-off of 10,000 and manufactured by Millipore Corporation, model number PBGC07610) to obtain 50 ml of condensate. 300 ml of distilled water were added to the condensate, and the resulting solution was again condensed in the same manner. This cycle of diluting the
30 condensate with distilled water followed by re-condensation was repeated five times to eliminate excess ethanol. The resulting condensate was freeze-dried to obtain 0.8 g of the title compound poly(PEG₃₀₀-MA)ea (Compound No. 6) as an oily compound.

49

The carboxyl group content in 1 g of poly(PEG₃₀₀-MA)ea (Compound No. 6) was determined in the same manner as described in Example 1 above, and was determined to be 2.16 mmols. Using a calculation similar to that in Example 3 for the ammonolysis product, the theoretical carboxyl group content in 1 g of poly(PEG₃₀₀-MA)ea (Compound No. 6) where all maleic anhydride residues have been subjected to alcoholysis was determined by calculation, and was determined to be 1.47 mmols. From the result, the ratio of maleic anhydride residues in the title compound subjected to alcoholysis to the total number of maleic anhydride residues in the starting material was calculated, and was determined to be 0.6. Thus, it can be seen that 60 % of maleic anhydride residues in the starting material were subjected to alcoholysis, and the remaining 40 % of maleic anhydride residues were subjected to hydrolysis.

Example 7

Preparation of product of ammonolysis of poly(PEG₁₅₀₀-MA) [poly(PEG₁₅₀₀-MA)a]] wherein m=28-38, R¹=NH₂, comp. ratio= about 1.1, av. deg. pol.=10-15 and hyd. ratio= about 4.6 (Compound No. 7)

14.5 g of ammonia water (ammonia concentration 28 wt%) were added to 1.5 g of poly(PEG₁₅₀₀-MA) (AM-1510K, manufactured by NOF Corporation) to dissolve it, and the solution thus obtained was stirred at room temperature for 20 hours. At the end of this time, 300 ml of distilled water were added to the solution, and glacial acetic acid was further added to neutralize said solution. The resulting solution was condensed using an ultrafiltration membrane made of polyethersulfone (having a molecular weight cut-off of 10,000 and manufactured by Millipore Corporation, model number PBGC07610) to obtain 50 ml of condensate. 300 ml of distilled water were added to the condensate, and the resulting solution was again condensed in the same manner. This cycle of diluting the condensate with distilled water followed by re-condensation was repeated five times to eliminate excess ammonia. The resulting condensate was freeze-dried to obtain 0.7 g of the title compound poly(PEG₁₅₀₀-MA)a (Compound No. 7) as an only compound.

The carboxyl group content in 1 g of poly(PEG₁₅₀₀-MA)a was determined in the same manner as in Example 1, and was found to be 1.12 mmols. As with the ammonolysis of poly(PEG₃₀₀-MA)a of Example 3, there is a possibility that the

maleic anhydride residues in the poly(PEG₁₅₀₀-MA) starting material could be subjected to both ammonolysis and hydrolysis. Therefore the ratio of maleic anhydride residues subjected to ammonolysis to the ratio of maleic anhydride residue subjected to hydrolysis was calculated as follows.

5

In Example 2, the carboxyl group content in 1 g of poly(PEG₁₅₀₀-MA)h (Compound No. 2) was determined. This gives the figure for carboxyl group content when all maleic acid residues are fully hydrolysed (1.63 mmols per 1 g of polymer). From this result, the weight of poly(PEG₁₅₀₀-MA)h (Compound No. 2) per mol of carboxyl group ($1/1.63 \times 10^{-3}$ g) and the weight of poly(PEG₁₅₀₀-MA)h (Compound No. 2) per mol of ring-opened maleic acid residue [2 x the weight of poly(PEG₁₅₀₀-MA)h (Compound No. 2) per mol of ring-opened maleic acid residue, since there are 2 carboxyl groups per fully hydrolysed maleic acid residue] were calculated, giving the results 613 g and 1,227 g, respectively. From the thus-obtained weight of poly(PEG₁₅₀₀-MA)h, and using an approach similar to that in Example 3 above, the theoretical carboxyl group content per 1 g of poly(PEG₁₅₀₀-MA)a (Compound No. 7) where all maleic anhydride residues have been subjected to ammonolysis, was calculated, and was determined to be 0.82 mmols. From these values and the actual carboxyl group content of poly(PEG₁₅₀₀-MA)a (Compound No. 7) measured above (1.12 mmols), the ratio of maleic anhydride residues in the title compound subjected to ammonolysis to the total number of maleic anhydride residues in the starting material was determined by calculation, and was found to be 0.6. Thus, it was confirmed that 60 % of the maleic anhydride residues in the poly(PEG₁₅₀₀-MA) starting material were subjected to ammonolysis, and the remaining 40 % of maleic anhydride residues were subjected to hydrolysis.

25

Example 8

Preparation of reaction product of dimethylamine and poly(PEG₁₅₀₀-MA)
[poly(PEG₁₅₀₀-MA)dma)] wherein m=28-38, R¹=NMe₂, comp. ratio= about 1:1,
av. deg. pol.=10-15 and hyd. ratio= about 0.10 (Compound No. 8)

30

11 g of an aqueous dimethylamine solution (having a concentration of 50 wt%) were added to 1 g of poly(PEG₁₅₀₀-MA) (AM-1510K, manufactured by NOF Corporation) to dissolve it, and the solution thus obtained was stirred at room

temperature for 20 hours. At the end of this time, 300 ml of distilled water were added to the solution, and glacial acetic acid was further added to neutralize the solution. The resulting solution was condensed using an ultrafiltration membrane made of polyethersulfone (having a molecular weight cut-off of 10,000 and manufactured by Millipore Corporation, model number PBGC07610) to obtain 50 ml of condensate. 300 ml of distilled water were added to the condensate, and the resulting solution was again condensed in the same manner. This cycle of diluting the condensate with distilled water followed by re-condensation was repeated five times to eliminate excess dimethylamine. The resulting condensate was freeze-dried to obtain the title compound poly(PEG₁₅₀₀-MA)dma (Compound No. 8) as an oily compound.

The carboxyl group content in 1 g of poly(PEG₁₅₀₀-MA)dma (Compound No. 8) was determined in the same manner as in Example 1, and was calculated to be 0.82 mmols. Using a similar approach to that used in Example 3, the theoretical carboxyl group content in 1 g of poly(PEG₁₅₀₀-MA)dma where all maleic anhydride residues have been subjected to aminolysis was determined by calculation to be 0.80 mmol. From these results, the ratio of maleic anhydride residues in the title compound subjected to aminolysis to the total number of maleic anhydride residues in the starting material was determined by calculation, and was found to be 1.0. Thus, it was confirmed that substantially all maleic anhydride residues had been subjected to aminolysis by dimethylamine.

Example 9

Preparation of complexes of polymeric modifiers of Examples 1 to 8 with OCIF

Each of the polymeric modifiers prepared in Examples 1 to 8 was dissolved in phosphate buffer saline (PBS) pH 6.0 (which is solution obtained by mixing a solution containing 10 mM disodium hydrogen phosphate and 150 mM sodium chloride and a solution containing 10 mM sodium dihydrogen phosphate and 150 mM sodium chloride at a suitable ratio to give a buffer having a pH of 6.0) to prepare solutions having a modifier concentration of from 1 to 20 mg/ml. For each solution of each modifier in turn, 0.625 ml of the prepared polymeric modifier solution and 0.625 ml of a solution containing purified human mature OCIF (OCIF prepared as described in

WO 96/26217 and EP 816380) [protein concentration. 2 mg/ml, medium PBS (pH 6.0)] were mixed, and the mixture thus obtained was allowed to stand at 4°C to 37°C for at least one hour, to give a series of solutions [medium PBS (pH 6.0)] containing OCIF modified with the polymeric modifiers of Examples 1 to 8 in which the ratio of modifier to OCIF in each solution is determined by the concentration of the modifier solution added and the reaction conditions. The weight ratios of modifier/OCIF for some of the complexes prepared (and the conditions under which they were prepared) are shown in Table 6 in Test Example 2 below. The molecular size of each of the resulting complexes was measured as explained in Test Example 11 below. The detection rate of OCIF by ELISA in the complexes was measured as described in Test Example 3 below.

Additionally, for each of the polymeric modifiers, a solution of OCIF modified with the polymeric modifier was prepared in the same manner except that PBS with a pH of 7.4 was used as the medium.

Example 10

Preparation of sodium salt of product of ammonolysis of poly(PEG₃₀₀-MA) [poly(PEG₃₀₀-MA)_n]-NaI wherein m=6-16, R¹=NH₂, comp. ratio= about 1:1, av. deg. pol.=30-40 and hyd. ratio= about 3.1, 6.9 (Compound No. 9)

A copolymer of polyoxyethylene allyl methyl diether (m = 6-16, Alk = ethylene, R¹ = hydrogen and R² = methyl) and maleic anhydride, in which the polyoxyethylene side chain has an average molecular weight of about 500 and the average degree of polymerization of the main chain is in the range of from 30 to 40 (AM-0530K, manufactured by NOF Corporation, having a lot number of M34529) [hereinafter referred to as "poly(PEG₃₀₀-MA)"] was used as the starting material. 61 ml of a 0.5M ammonia/1,4-dioxane solution were added to 10.1 g of said poly(PEG₃₀₀-MA) starting material, and the resulting solution was stirred at 25°C for 20 hours. At the end of this time, 200 ml of diethyl ether and 100 ml of a 0.2M sodium hydroxide aqueous solution were added to the solution, and the mixture vigorously shaken for about 3 minutes. After allowing phase separation of the organic and aqueous layers, the lower layer was collected. 200 ml of diethyl ether and

60 ml of 1,4-dioxane were added to the collected layer, and the solution thus obtained was again vigorously shaken. After phase separation, the resulting lower layer was collected and then freeze-dried to obtain 10.1 g of the title compound poly(PEG₃₀₀-MA)a sodium salt (Compound No. 9) as a yellow solid.

5

The carboxyl group content and hydrolysis ratio for the title polymer was determined as described in Test Example 1 below

Example 11

10 Preparation of product of ammonolysis of poly(PEG₃₀₀-MA) [poly(PEG₃₀₀-MA)a] wherein m=6-16, R¹=NH₂, comp. ratio= about 1.1, av. deg. pol.=30-40 and hyd. ratio= about 1.4, 8.6 (Compound No. 10)

15 9.5 g of 28 w/w% ammonia water were added to 1 g of poly(PEG₃₀₀-MA) (AM-0530K, manufactured by NOF Corporation, having a lot number of M34529) to dissolve it, and the solution thus obtained was stirred at 25°C for 4 hours. At the end of this time, 250 ml of 0.28 % ammonia water were added, and the resulting solution was condensed using an ultrafiltration membrane made of polyethersulfone (having a molecular weight cut-off of 10,000 and manufactured by Millipore Corporation,
20 model number PBGC07610), and the condensate thus obtained was freeze-dried to obtain 0.8 g of the title compound poly(PEG₃₀₀-MA)a (Compound No. 10) as an oily compound

25 The carboxyl group content and hydrolysis ratio for the title polymer was determined as described in Test Example 1 below

Example 12

30 Preparation of reaction product of dimethylamine and poly(PEG₃₀₀-MA) [poly(PEG₃₀₀-MA)dma)-Na salt] wherein m=6-16, R²=NMe₂, comp. ratio= about 1.1, av. deg. pol.=30-40 and hyd. ratio= about 2, 9, 7, 1 (Compound No. 11)

35 35 g of a 50 w/w% aqueous dimethylamine solution were added to 5 g of poly(PEG₃₀₀-MA) (AM-0530K, lot number M34529 obtained from NOF

Corporation) to dissolve it, and the resulting solution was stirred at 25°C for 3 hours, then further stirred at 4°C for 16 hours. At the end of this time, 100 ml of a 0.1M sodium hydroxide aqueous solution were added, and the solution thus obtained was freeze-dried to obtain 5.4 g of the title compound poly(PEG₅₀₀-MA)dma-Na salt (Compound No. 11) as a yellow solid.

The carboxyl group content and hydrolysis ratio for the title polymer was determined as described in Test Example 1 below.

10

Example 13

Preparation of poly(PEG₃₀₀-MA) hydrolysate [poly(PEG₃₀₀-MA)h] wherein m=6-16, R¹=OH, comp. ratio= about 1:1, av. deg. pol.=30-40 and hyd. ratio= about 10.0 (Compound No. 12)

15

17 ml of distilled water were added to 1 g of poly(PEG₃₀₀-MA) (AM-0530K, manufactured by NOF Corporation, having a lot number of M34529) to dissolve it, and the resulting solution was stirred at 40°C for 4 hours. At the end of this time, 250 ml of 0.28 w/w% ammonia water were added thereto, and the solution thus obtained was condensed using an ultrafiltration membrane made of polyethersulfone (having a molecular weight cut-off of 10,000, and manufactured by Millipore Corporation, model number FBGC07610). The condensate thus obtained was freeze-dried to obtain 0.7 g of the title compound poly(PEG₃₀₀-MA)h (Compound No. 12) as an oily compound.

20

25

The carboxyl group content and hydrolysis ratio for the title polymer was determined as described in Test Example 1 below.

Example 14

Preparation of complexes of polymeric modifiers of Examples 10 to 13 with OCIF

30

Each of the polymeric modifiers prepared in Examples 10 to 13 was dissolved in phosphate buffer saline (PBS) pH 7.0 (which is a solution obtained by mixing a

solution containing 10 mM disodium hydrogen phosphate and 150 mM sodium
 chloride and a solution containing 10 mM sodium dihydrogen phosphate and 150 mM
 sodium chloride at a suitable ratio to give a buffer having a pH of 7.0) to prepare
 solutions having a range of modifier concentrations in the range of from 1.25 to 105
 5 mg/ml. For each polymeric modifier in turn, the polymeric modifier solutions thus
 obtained and a solution containing purified human mature OCIF (OCIF prepared as
 described in WO 96/26217 and EP 816380) [protein concentration 0.25 to 14 mg/ml,
 medium PBS (pH 6.0)] were mixed at a 1:1 ratio by volume to give solutions having
 different weight ratios between the modifier and OCIF. The solutions thus obtained
 10 were adjusted to pH 5.0, 5.5, 6.0, 6.5, 7.0 or 7.4 using 1 M hydrochloric acid solution
 or 1 M aqueous sodium hydroxide. Each of the solutions thus obtained was allowed
 to stand at 25°C for between 12 hours and one week to obtain a solution of a complex
 of the polymeric modifier of the present invention and OCIF. The prepared solutions
 were stored at 4°C. The molecular size of the resulting complexes was measured as
 15 explained in Test Examples 6 and 11 below. The detection rate of OCIF by ELISA in
 the complexes was measured as described in Test Example 8 below.

Example 15

20 Preparation of sodium salt of the product of ammonolysis of poly(PEG₃₀₀-MA)
[poly(PEG₃₀₀-MA)_n-Na salt] having controlled molecular size wherein m=6-16,
K²=NH₂, comp. ratio= about 1:1, av. deg. pol as shown below and hydrolysis
ratio= about 1.4:8.6 (Compound Nos. 13-19)

25 100 mg of the sodium salt of poly(PEG₃₀₀-MA)_n (Compound No. 9) obtained
 in Example 10 were dissolved in 1 ml of a phosphate buffer saline solution (PBS
 having a pH of 7.4 obtained by mixing an aqueous solution containing 10 mM of
 disodium hydrogenphosphate and 150 mM of sodium chloride with an aqueous
 solution containing 10 mM of sodium dihydrogenphosphate and 150 mM of sodium
 chloride at a suitable ratio). The solution thus obtained was fractionated by gel
 30 filtration chromatography. Two different gel filtration conditions were used, as
 follows

(1) Fractionation method using Superose 6 (hereinafter referred to as the SRF method)

Column. Superose 6 HR 10/30 Amersham Bioscience

Column temperature 8°C

Mobile phase. PBS (pH 7.4)

Wavelength for detection 280 nm

5 Flow rate 0.3 ml/min

Amount injected on to column. 100 µl

(2) Fractionation method using Superdex 200 (hereinafter referred to as the SDF method)

10 Column Superdex 200 HR 16/60 Amersham Biosciences

Column temperature room temperature

Mobile phase PBS (pH 7.4)

Wavelength for detection 280 nm

Flow rate 2 ml/min

15 Amount injected on to column 5 ml

Polymeric modifiers that were eluted by these two fractionation methods in an elution time of x to y minutes were defined as poly(PEG₅₀₀-MA) _{x} -I Ia(SRF _{x - y}) and poly(PEG₅₀₀-MA) _{x} -Na(SDF _{x - y}) respectively

20

The concentration of the polymeric modifier in each fraction (aqueous solution) was determined by high performance liquid chromatography The conditions used in the high performance liquid chromatography are as follows

25 Column Shodex OHpak SB-806M HQ (available from SHOWA DENKO K.K.)

Guard column Shodex OHpak SB-G (available from SHOWA DENKO K.K.)

Column temperature 40°C

Mobile phase aqueous solution of 50 mM disodium hydrogenphosphate adjusted to pH 7.0 with 1M hydrochloric acid

30 Wavelength for detection 210 nm

Flow rate 0.5 ml/min

Amount injected on to column 50 µl

Poly(PEG₅₀₀-MA)_n-Na(SRF_{x-y}) and poly(PEG₅₀₀-MA)_n-Na(SDF_{x-y}) respectively obtained by fractionation according to the SRF method and the SDF method were subjected to further gel filtration chromatography (SRF method) using the same elution conditions as described above for the first fractionation according to the SRF method to evaluate the molecular size of each of the samples after fractionation. Proteins each having a known molecular size (available from Amersham Bioscience) were used as standard samples. In this respect, the molecular weight and molecular size of each of the proteins are shown in the relevant catalogue from which they were purchased.

10

The calculated molecular size of the polymer modifiers obtained by fractionation are shown in Table 1 below

Table 1

	Molecular weight	Stokes radius (nm)	Retention time (min)	
Standard protein				
Thyroglobulin	669 k	8.50	38.48	
Ferritin	440 k	6.10	44.85	
Catalase	232 k	5.22	48.77	
Aldolase	158 k	4.81	50.11	
Albumin	67 k	3.55	51.85	
Ovalbumin	43 k	3.05	53.95	
Chymotrypsinogen A	25 k	2.09	59.26	
Ribonuclease A	13.7 k	1.64	60.23	
Modifier of Ex. 15				Cpd No
poly(PEG ₃₀₀ -MA) _n -Na (non fractionated)		9.3 or less**	35-65*	9
poly(PEG ₃₀₀ -MA) _n -11a (SRF ₃₀₋₃₅) yield 23%		3.1-6.2**	45-55*	13
poly(PEG ₃₀₀ -MA) _n -Na (SRF ₃₅₋₄₀) yield 20%		1.5-4.7**	50-60*	14
poly(PEG ₃₀₀ -MA) _n -Na (SRF ₆₀₋₆₅) yield 12%		3.1 or less**	55-65*	15
poly(PEG ₃₀₀ -MA) _n -Na (SDF ₄₆₋₅₂) yield 22%		7.8 or less**	40-65*	16
poly(PEG ₃₀₀ -MA) _n -Na (SDF ₅₂₋₅₈) yield 22%		6.2 or less**	45-65*	17
poly(PEG ₃₀₀ -MA) _n -Na (SDF ₅₈₋₆₄) yield 13%		3.1 or less**	55-65*	18
poly(PEG ₃₀₀ -MA) _n -Na (SDF ₆₀₋₇₀) yield 13%		3.1 or less**	55-65*	19

* The presence of a span of the retention time indicates that the sample has a molecular weight distribution.

** This is a value calculated from a calibration curve produced using the molecular size and retention time of each of the standard proteins. In those cases where a lower limit is not shown, that is, where the Stokes radius is shown as "XX or less", it can be said that the sample contains a low molecular weight component which can not
5 evaluated by gel filtration chromatography carried out under the conditions of this example

Using this approach, various poly(PEG₅₀₀-MA)_n-Na polymers having different molecular sizes were prepared (Compound Nos 13-19). The average degree of
10 polymerization of Compound Nos 13, 14, 15, 16, 17, 18 and 19 was calculated as in earlier examples and was found to be <30, <<30, <<<30, <30, <<30, <<<30 and <<<30 respectively

Example 16

15 Preparation of the product of ammonolysis of poly(PEG₁₅₀₀-MA) [poly(PEG₁₅₀₀-MA)_n] having controlled molecular size wherein m=28-36, R¹=NH₂, comp. ratio= about 1.1, av. deg. pol. is as given below (Compound Nos. 20-22)

Starting with [poly(PEG₁₅₀₀-MA)_n] (Compound No 7) prepared in Example 7
20 above as a starting material and using the same approach as used in Example 15 above, Poly(PEG₁₅₀₀-MA)_n(SRF₂₋₇) was prepared in the same manner as in Example 15. The elution conditions for the SRF elutions were the same as in Example 15. The yields of the polymer modifiers obtained by fractionation are shown in Table 2 below

Table 2

Modifier of Example 16	Compd. No
poly(PEG ₁₅₀₀ -MA) _n (non fractionated)	7
poly(PEG ₁₅₀₀ -MA) _n (SRF ₃₀₋₃₅) 12.2%	20
poly(PEG ₁₅₀₀ -MA) _n (SRF ₃₅₋₆₀) 13.1%	21
poly(PEG ₁₅₀₀ -MA) _n (SRF ₆₀₋₆₅) 16.4%	22

5 Using this approach, various poly(PEG₁₅₀₀-MA)_n polymers having different molecular sizes were prepared (Compound Nos. 20-22). The average degree of polymerisation of Compound Nos. 20, 21 and 22 was calculated as in earlier examples and was found to be <10, <<10 and <<<10 respectively.

Example 17

10 Preparation of complexes of polymeric modifiers of
Examples 15 and 16 with OCIF

Polymer-OCIF complexes of the present invention were prepared as aqueous solutions using essentially the same preparative approach as in Example 14 above using aqueous solutions of Compound Nos. 13 to 22 prepared in Examples 15 and 16 above (medium PBS having a pH of 7.4) and an aqueous solution of purified human mature OCIF (OCIF prepared as described in WO 96/26217 and EP 816380) (medium PBS having a pH of 6.0) as the starting materials. More specifically, for each of the modifiers a 0.5 mg/ml solution thereof in PBS (pH 7.4) (prepared as described in Example 9 above) was mixed with a solution of 0.5 mg/ml OCIF in PBS (pH 6.0) at a volume ratio of 1:1. The resulting reaction mixtures were allowed to stand at 25 °C for 7 days. The molecular size of the resulting complexes was measured as explained in Test Example 11 below.

Example 18

Preparation of the product of ammonolysis of poly(PEG₅₀₀-MA) [poly(PEG₅₀₀-MA)_n-Na salt] having controlled molecular size. (a) m=6-16, R¹=NH₂, comp. ratio= about 1.2 and av. deg. pol.=20-30 (Comp. No. 27) and (b) m=6-16, R¹=NH₂, comp. ratio= about 1.1 and av. deg. pol.= about 15 (Comp. No. 28)

Two polymers of the present invention poly(PEG₅₀₀-MA)_n (Compound No. 27) and poly(PEG₅₀₀-MA)_n (Compound No. 28) were prepared as follows. The starting material for the former is poly(PEG₅₀₀-MA) (AM-0510K manufactured using a procedure similar to that disclosed in Japanese Patent No. 2621308 and Japanese Patent Application Publication Nos. 2003-105040 and 2003-104003), a copolymer of polyoxyethylene allyl methyl diether (m = 6-16, Alk = ethylene, R¹ = hydrogen and R² = methyl) and maleic anhydride, in which the polyoxyethylene side chain has an average molecular weight of about 500 and the average degree of polymerization of the main chain is in the range of from 20 to 30, the ratio of polyoxyethylene allyl methyl diether units to maleic anhydride units being 1.2 and the average molecular weight being about 6,000 [number-average molecular weight is about 6,000 and the molecular weight distribution index (Mw/Mn) is about 1.25]. The starting material for the latter is poly(PEG₅₀₀-MA) (AM-0515K manufactured using a procedure similar to that disclosed in Japanese Patent No. 2621308 and Japanese Patent Application Publication Nos. 2003-105040 and 2003-104003), a copolymer of polyoxyethylene allyl methyl diether (m = 6-16, Alk = ethylene, R¹ = hydrogen and R² = methyl) and maleic anhydride, in which the polyoxyethylene side chain has an average molecular weight of about 500, the average degree of polymerization of the main chain is about 15 and the average molecular weight is about 10,000. The starting materials were both subjected to ammonolysis using conditions essentially identical to those used in Example 10 to give the title compounds poly(PEG₅₀₀-MA)_n-Na salt (Compound No. 27) and poly(PEG₅₀₀-MA)_n-Na salt (Compound No. 28). The carboxyl group content for the title polymer was determined as described in Test Example 1 below and found to be 2.73 mmol/g for Compound No. 27 and 2.05 mmol/g for Compound No. 28.

Example 19**Preparation of complexes of the polymeric modifiers of
Example 18 with OCIF**

5 Polymer-OCIF complexes of the present invention were prepared as aqueous solutions using essentially the same preparative approach as in Example 14 above using aqueous solutions of Compound Nos. 27 and 28 prepared in Example 18 above as the starting materials. More specifically, for each of the modifiers a 5 mg/ml solution thereof in PBS (pH 7.4) was mixed with a solution of 5 mg/ml human mature
10 OCIF in PBS (pH 6.0) at a volume ratio of 1:1. The pH of the resulting mixture was adjusted to 5.5 with 1M hydrochloric acid and then the reaction mixture was allowed to stand at 25 °C for 7 days. The molecular size of the resulting complexes was measured as explained in Test Example 11 below.

15

Example 20**Evaluation of composition of poly(PEG₅₀₀-MA) and preparation and evaluation of poly(PEG₅₀₀-MA)s (Compound Nos. 29-53) under various conditions****20(1) Determination of composition ratio of poly(PEG₅₀₀-MA)**

20

A number of copolymers of polyoxyethylene allyl methyl diether and maleic anhydride, poly(PEG₅₀₀-MA), of differing composition were tested to determine the ratio of PEG allyl methyl diether and maleic anhydride units (the composition ratio) therein (different lots of AM-0510K manufactured using a procedure similar to that disclosed in Japanese Patent No. 2621308 and Japanese Patent Application
25 Publication Nos. 2003-105040 and 2003-104003), a random copolymer of polyoxyethylene allyl methyl diether ($m = 6-16$, Alk = ethylene, $R^1 = \text{hydrogen}$ and $R^2 = \text{methyl}$) and maleic anhydride, in which the polyoxyethylene side chain has an average molecular weight of about 500 and the average degree of polymerization of the main chain is in the range of from 20 to 30. The number-average molecular
30 weight (M_n) and molecular weight distribution index (M_w/M_n , where M_w is weight-average molecular weight) of each lot of the copolymers tested is shown below. The molecular weight (MW) of each lot of poly(PEG₅₀₀-MA) was determined by gel filtration chromatography using poly(ethylene glycol) with a predetermined MW as a

standard. Consequently, the MW of poly(PEG₃₀₀-MA) shown below is not the absolute MW, but the relative MW measured using PEG as a standard

- 5 M3O538 $M_n = 6431$, $M_w/M_n = 1.27$
 M3N549 $M_n = 6360$, $M_w/M_n = 1.23$
 M3N550 $M_n = 5891$, $M_w/M_n = 1.28$
 M3N569 $M_n = 5897$, $M_w/M_n = 1.25$

10 In order to determine the composition ratio of each of the copolymers, it was necessary to convert them to the corresponding sodium salts of the hydrolysed copolymers, i.e. poly(PEG₃₀₀-MA)_n sodium salt. The hydrolysis conditions used are as follows

15 25 ml of 1,4-dioxane, 100 ml of ether and 42 ml of 0.1 N NaOH aqueous solution were added to 1 g of poly(PEG₃₀₀-MA) (lot M3O538). The resulting mixture was then vigorously shaken and, after allowing it to settle, the aqueous layer thus obtained was collected. The aqueous layer thus obtained was stirred at 40 °C for 2 h after filtering through filter paper (70-4 ± 40 m/m obtained from Iihon Fikagaku-kiki Corporation). At the end of this time, the resulting solution was freeze-dried. The
 20 sodium salt of the hydrolyzed product of the starting material, namely poly(PEG₃₀₀-MA)_n (lot M3O538) sodium salt, was obtained as a yellow solid (100% yield).

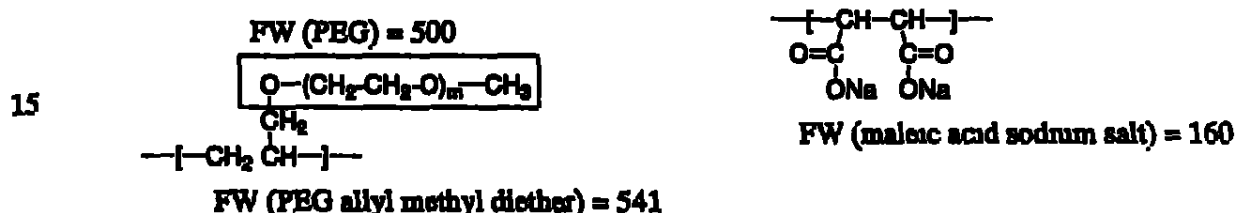
12 ml of 1,4-dioxane and 9 ml of 1 N NaOH aqueous solution were added to 1 g of poly(PEG₃₀₀-MA) (lot M3N549). The resulting mixture was then stirred at
 25 room temperature for 24 h. At the end of this time, 1 ml of 1 N NaOH aqueous solution was added and the resulting mixture was freeze-dried. The sodium salt of the hydrolyzed product of the starting material, namely poly(PEG₃₀₀-MA)_n (M3N549) sodium salt was obtained as a yellow solid (100% yield)

30 5 ml of 1,4-dioxane and 9 ml of 1 N NaOH aqueous solution were added to 2 g of poly(PEG₃₀₀-MA) (lot M3N550). The resulting mixture was then stirred at 40 °C for 23 h. At the end of this time, the reaction mixture was freeze-dried. The sodium salt of the hydrolyzed product of the starting material, namely poly(PEG₃₀₀-MA)_n (lot M3N550) sodium salt was obtained as a yellow solid (100% yield)

5 ml of 1,4-dioxane and 9 ml of 1 N NaOH aqueous solution were added to 2 g of poly(PEG₅₀₀-MA) (lot M3N569). The resulting mixture was then stirred at 40 °C for 23 h. At the end of this time, the reaction mixture was freeze-dried. The sodium salt of the hydrolyzed product of the starting material, namely poly(PEG₅₀₀-MA)_n was obtained as a yellow solid (100% yield).

The carboxyl group content of each of the poly(PEG₅₀₀-MA)_n sodium salts thus prepared was measured by conductometric titration as described above. The results are shown in Table 3 below.

Poly(PEG₅₀₀-MA)_n sodium salt comprises the following two monomer units



If the number of maleic acid sodium salt monomer units per 1 unit of PEG allyl methyl diether is defined as "a", and the theoretical minimum repeating unit comprises one unit of PEG allyl methyl diether and "a" units of sodium maleate, then the formula weight (FW) of the minimum repeating unit is given by equation 1

25

$$\begin{aligned} & \text{FW}[(\text{PEG allyl methyl diether})_1 + (\text{maleic acid sodium salt})_a] \\ &= \text{FW}(\text{PEG allyl methyl diether}) + a [\text{FW}(\text{maleic acid sodium salt})] \\ &= 541 + 160a \end{aligned} \quad (\text{Eq. 1})$$

The number of carboxyl groups on the minimum repeating unit of poly(PEG₅₀₀-MA)_n sodium salt is 2a. Consequently, the carboxyl group content (C, mmol/g) on the minimum repeating unit of poly(PEG₅₀₀-MA)_n sodium salt is given by equation 2

30

$$C = 2a / (541 + 160a) * 1000 \quad (\text{Eq. 2})$$

The ratio of the number of maleic acid sodium salt units to the number of PEG allyl methyl diether units in the actual poly(PEG₃₀₀-MA)_n sodium salts is the same as the ratio in the minimum repeating units. Consequently, the value of C is also the same in the minimum repeating unit and in the actual poly(PEG₃₀₀-MA)_n sodium salts, the carboxyl group contents of which were determined by conductometric titration (see above). Thus, by measuring the carboxyl group content and using Equation 2, the value of the composition ratio "a", namely the number of maleic acid sodium salt units per 1 unit of PEG allyl methyl diether [which is the monomer composition of poly(PEG₃₀₀-MA)] can be obtained. The results are shown in Table 3 below.

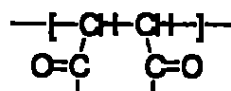
Table 3

		poly(PEG500-MA) lot	Amount of carboxyl groups (mmol/g)	MA/PEG allyl methyl ether
poly(PEG500-MA) _n sodium salt	#1	M30538	4.86	2.01
	#2	M3N549	5.21	2.42
	#3	M3N550	5.98	3.10
	#4	M3N569	6.14	3.26

The composition ratio of the poly(PEG₃₀₀-MA)_n sodium salts was in the range of from 1.2 to 1.33. Obviously, the composition ratio is the same in poly(PEG₃₀₀-MA) and poly(PEG₃₀₀-MA)_n sodium salt, such that monomer composition ratios of the different starting copolymers poly(PEG₃₀₀-MA) were confirmed to be in the range of from 1.2 to 1.33.

20(2) Ammonolysis of poly(PEG₅₀₀-MA) under different conditions to give poly(PEG₅₀₀-MA)s (Compound Nos. 29-53) and determination of hydrolysis ratios in said compounds

By using the composition ratio (a) and the carboxyl group content of the poly(PEG₅₀₀-MA)_n sodium salts, the hydrolysis ratio (i.e. the ratio of maleic acid anhydride units in the starting polymer subjected to ammonolysis to those subjected to hydrolysis) can be calculated as follows. The formula of the sodium salt of amidated maleic acid (maleamic acid, sodium salt) unit is shown below



5

In the same manner as the case of the poly(PEG₃₀₀-MA)_h sodium salts above, it can be assumed that the minimum unit of poly(PEG₃₀₀-MA)_a sodium salt comprises one PEG allyl methyl diether unit, ax units of maleamic acid sodium salt and a(1 - x) units of maleic acid sodium salt. The formula weight of the minimum unit of poly(PEG₃₀₀-MA)_a sodium salt is given by the following Equation 3

10

$$\begin{aligned}
 & \text{FW}[(\text{PEG allyl methyl diether})_1 + \\
 & \quad (\text{maleamic acid sodium salt})_{ax} + (\text{maleic acid sodium salt})_{a(1-x)}] \\
 & = \text{FW}(\text{PEG allyl methyl diether}) + \\
 & \quad ax[\text{FW}(\text{maleamic acid sodium salt})] + a(1-x)[\text{FW}(\text{maleic acid sodium} \\
 & \quad \text{salt})] \\
 & = 541 + 137ax + 160a(1-x) \\
 & = 541 + 160a - 23ax \qquad \qquad \qquad (\text{Eq 3})
 \end{aligned}$$

15

20

Since the carboxyl group content in the minimum unit of poly(PEG₃₀₀-MA)_a sodium salt is $ax + 2a(1-x) = 2a - ax$, the carboxyl group content (C, mmol/g) in the minimum unit of poly(PEG₃₀₀-MA)_a sodium salt can be derived from Equation 4

$$C = 1000 \times (2a - ax) / (541 + 160a - 23ax) \qquad \qquad \qquad (\text{Eq 4})$$

25

The hydrolysis ratio (1-x) x can thus be determined from Equation 4 by using the carboxyl group content (C, mmol/g) that can be obtained by conductometric titration of poly(PEG₃₀₀-MA)_a sodium salt and the value of "a" that was obtained above.

30

Several examples of the preparation of poly(PEG₃₀₀-MA)_a, and the calculated hydrolysis ratio in the product poly(PEG₃₀₀-MA)_a are shown below

(a) 0.5 M ammonia/1,4-dioxane solution (amounts as given in Table 4 below) was added to 100 mg of poly(PEG₅₀₀-MA), and the obtained solution was stirred at the temperatures and times given in Table 4 below. At the end of the reaction time, about 0.4 ml (ranging from 0.3 to 0.5 ml) of 1N NaOH aqueous solution was added to the reaction mixture. The resulting solution was freeze-dried to obtain the sodium salt of poly(PEG₅₀₀-MA)_a as a solid material.

The "reaction rate of amine component" of each of the poly(PEG₅₀₀-MA)_a sodium salts [i.e. the percentage of maleic acid anhydride units in the starting polymer subjected to ammonolysis (100*x)] prepared under these various reaction conditions is shown in Table 4 below.

Table 4

		poly(PEG-MA) lot	0.5 M NH ₃ added	Reaction		Amount of carboxyl groups (mmol/g polymer)	Reaction rate of amine component (%)
				Temp.	Time		
poly(PEG ₅₀₀ -MA) _a sodium salt	#8	M3N549	38ml/g	25°C	20h	2.79	98.5
	#9	M3N549	17.5ml/g	25°C	20h	2.87	98.4
	#10	M3N549	8ml/g	25°C	24h	3.28	80.9
	#11	M3N549	10ml/g	25°C	24h	3.01	90.9
	#12	M3N549	15ml/g	25°C	24h	2.91	94.6
	#13	M3N549	20ml/g	25°C	24h	3.11	86.9
	#14	M3N549	11ml/g	25°C	24h	3.28	81.1
	#15	M3N549	12ml/g	25°C	24h	3.02	90.3
	#16	M3N549	13ml/g	25°C	24h	2.98	92.1
	#17	M3N549	7ml/g	25°C	24h	3.94	53.8
	#18	M3N549	8ml/g	25°C	24h	3.08	88.1
	#19	M3N549	9ml/g	25°C	24h	3.29	80.0
	#20	M3N549	9ml/g	15°C	24h	3.05	89.4
	#27	M3N549	9ml/g	25°C	24h	3.40	75.6
	#28	M3N549	9ml/g	30°C	24h	3.02	90.6
	#29	M3N549	9ml/g	37°C	24h	3.15	85.0
	#30	M3N549	9ml/g	25°C	16h	3.00	91.3
	#31	M3N549	9ml/g	25°C	1h	2.98	93.2
	#32	M3N549	9ml/g	25°C	5h	3.25	81.3
	#33	M3N549	9ml/g	25°C	4day	3.92	54.8
	#34	M3N549	9ml/g	25°C	21h	3.13	86.2
	#35	M3N549	9ml/g	25°C	21h	2.85	93.3
	#36	M3N549	9ml/g	25°C	21h	2.98	91.9
	#37	M3N549	9ml/g	25°C	21h	3.15	85.5
ammonium salt *DMF KN- dimethylformamide	#41	M3N550	ammonia gas	medium DMF*		3.43	82.7

#8-19, 25 and 27-37 are the title polymers poly(PEG₅₀₀-MA)_a (Compound Nos 29-

52). Each of these polymers is random and $m = 6-16$, $R^3 = \text{NH}_2$, composition ratio = 1:2:4 and average degree of polymerisation = 20-30.

As shown in Table 4, the reaction products poly(PEG₃₀₀-MA)_a (Compound Nos. 29-52) all had very high "reaction rates of the amine component", indicating that very nearly 100 % conversion to the amino group was obtained using the various reaction conditions described above.

Several further examples of alternative preparation methods of poly(PEG₃₀₀-MA)_a are described below

- 10 (b) 0.44 g of poly(PEG₃₀₀-MA) was dissolved in 9 ml of dimethylformamide. Ammonia gas was then bubbled into the solution at -50 °C. The final ammonia amount in the reaction mixture was 0.67g. The reaction mixture thus obtained was sealed in a glass ampoule under a nitrogen atmosphere, and then stirred at room temperature for 24h. At the end of this time, ammonia gas was evaporated under reduced pressure after the glass ampoule was opened. The reaction mixture was then added dropwise to 90 ml of diethyl ether. The precipitate thus obtained was collected and dried under reduced pressure. 0.28g of poly(PEG₃₀₀-MA)_a ammonium salt (Compound 1 to 53) (referred to as #41 in Table 4 above) was obtained as a yellow powder. The polymer is random and $m = 6-16$, $R^3 = NH_2$, composition ratio = 1.3/10 and average degree of polymerisation = 20-30.
- 15
- 20
- (c) Poly(PEG₃₀₀-MA)_a ammonium salt was obtained in the same way as (b) using toluene instead of dimethylformamide.
- 25 (4) Poly(PEG₃₀₀-MA)_a ammonium salt was obtained in the same way as (b) using 1,4-dioxane instead of dimethylformamide.

59

Example 21

Preparation of the product of alcoholysis reaction between ethanol and poly(PEG_m-MA) [poly(PEG_m-MA)ea-Na] wherein, m = 6-16, R₁ = OCH₂CH₃, comp. ratio= about 1:3, av. deg. pol.=20-30, hyd. ratio= about 3.1-6.9

5

(Compound No. 54)

Poly(PEG₅₀₀-MA) (AM-0510K, lot M3N550 manufactured using a procedure similar to that disclosed in Japanese Patent No 2621308 and Japanese Patent Application Publication Nos 2003-105040 and 2003-104003), a copolymer of polyoxyethylene allyl methyl diether (m = 6-16, Alk = ethylene, R₁=hydrogen and R₂=methyl) and maleic anhydride in which the polyoxyethylene side chain has an average molecular weight of about 500, the average degree of polymerization of the main chain is in the range of from 20 to 30, the ratio of polyoxyethylene allyl methyl diether units to maleic anhydride units is about 1.3, the number average molecular weight (M_n) is 5891 and the molecular weight distribution index (M_n/M_w) is 1.28 (see Example 20 above), was used as the starting material. 1 ml of ethanol was added to 100 mg of said starting compound and the resulting reaction mixture was allowed to stand for 16 hours at 40 °C. At the end of this time, 52 µl of a 2.5 N solution of sodium hydroxide in ethanol were added. The mixture thus obtained was concentrated at 35 °C by evaporation, and then dried under vacuum to obtain poly(PEG₅₀₀-MA)ea sodium salt (Compound No. 54) as an only material. The hydrolysis ratio was calculated using the method described in Examples 3 and 6 above. Namely, by determining the carboxyl group contents of the poly(PEG₅₀₀-MA)ea sodium salt (Compound No. 54) and the corresponding poly(PEG₅₀₀-MA)h sodium salt, the ratio of maleic anhydride residues in the title compound subjected to alcoholysis to the total number of maleic anhydride residues in the starting material was calculated, and was determined to be 0.69. Thus, it can be seen that 69 % of maleic anhydride residues in the starting material were subjected to alcoholysis, and the remaining 31 % of maleic anhydride residues were subjected to hydrolysis.

30

Example 22**Preparation of complexes of the polymeric modifier of Example 21 with OCIF**

Polymer-OCIF complexes of the present invention were prepared as aqueous solutions using essentially the same preparative approach as in Example 14 above using an aqueous solution of Compound No. 54 prepared in Example 21 above [Concentration of Compound No. 54, 17.2 mg/ml, medium, PBS pH 7.4 (which is a solution obtained by mixing an aqueous solution containing 10 mM of disodium hydrogrophosphate and 150 mM of sodium chloride with an aqueous solution containing 10 mM of sodium dihydrogenphosphate and 150 mM of sodium chloride at a suitable ratio to give a buffer having a pH of 7.4)] and an aqueous solution of purified human mature OCIF (OCIF prepared as described in WO 96/26217 and EP 816380) (OCIF concentration, 4 mg/ml, medium, buffer containing 10 mM phosphate ion and 150 mM NaCl, pH 6.0) More specifically, 0.472 ml of a 17.2 mg/ml solution of Compound No. 54 were added to 1.328 ml of said 4 mg/ml OCIF solution to give a solution containing 4.5 mg/ml of Compound No. 54 and 3 mg/ml of OCIF The resulting reaction mixture was allowed to stand for 3 days at 4, 10 or 25 °C to obtain aqueous solutions of the desired complexes of the present invention. The complex sizes were measured in Test Example 13 below

Example 23**Preparation of the product of alcoholysis reaction between ethanol and poly(PEG_m-MA) [poly(PEG_m-MA)_{es}] wherein, m = 6-16, R₁ = OCH₂CH₃, comp.ratio= about 1.3, av. deg. pol.=20-30 (Compound No. 55)**

Poly(PEG₃₀₀-MA) (AM-0510K, lot M3N550 manufactured using a procedure similar to that disclosed in Japanese Patent No. 2621308 and Japanese Patent Application Publication Nos. 2003-105040 and 2003-104003), a random copolymer of polyoxyethylene allyl methyl diether (m = 6-16, Alk = ethylene, R₁=hydrogen and R₂=methyl) and maleic anhydride in which the polyoxyethylene side chain has an average molecular weight of about 500, the average degree of polymerization of the main chain is in the range of from 20 to 30, the ratio of polyoxyethylene allyl methyl diether units to maleic anhydride units is about 1.3, the number average molecular weight (M_n) is 5891 and the molecular weight distribution index (M_n/M_w) is 1.28

(see Example 20 above), was used as the starting material. 0.5 ml of absolute ethanol were added to 50 mg of said starting compound and the resulting reaction mixture was allowed to stand at 37 °C for 24 hours. The title compound poly(PEG₅₀₀-MA)ca (Compound No. 55) was obtained as an ethanolic solution [poly(PEG₅₀₀-MA)ca conc. 100 mg/ml]

Example 24

Preparation of complexes of the polymeric modifier of Example 23 with OCIF

Polymer-OCIF complexes of the present invention were prepared as aqueous solutions using essentially the same preparative approach as in Example 14 above using the ethanolic solution of Compound No. 55 prepared in Example 23 above and an aqueous solution of purified human mature OCIF (OCIF prepared as described in WO 96/26217 and EP 816380) (OCIF concentration, 5 mg/ml, medium, buffer containing 10 mM phosphate ion and 150 mM NaCl, pH 6.0). More specifically, 37.5 µl of the ethanolic solution of Compound No. 55 were added to 0.5 ml of said 5 mg/ml OCIF solution and the resulting reaction mixture was allowed to stand for 3 days at 25 °C to give solutions of the desired complexes of the present invention. The complex sizes were measured in Test Example 13 below

Comparative Example 1

Preparation of monomethoxypolyethylene glycol-methyl vinyl ether-maleic acid copolymer (PEG-PMVMA)

The graft copolymer monomethoxypolyethylene glycol-methyl vinyl ether-maleic acid copolymer (PEG-PMVMA) was prepared according to the method disclosed in Example 2 of Japanese Patent Application (Kokai) No. Hei 11-302199

Comparative Example 2

Preparation of a complex comprising monomethoxypolyethylene glycol-methyl vinyl ether-maleic acid copolymer (PEG-PMVMA) and OCIF protein

Purified human OCIF (OCIF prepared as described in WO 96/26217 and EP 816380) modified with PEG-PMVA prepared as described in Comparative Example 1

above was prepared as a solution [medium PBS (pH 6.0)] in essentially the same manner as in Example 9. More specifically, 1 ml of OCIF solution [OCIF concentration 2 mg/ml, medium PBS (pH 6.0)] and 1 ml of PEG-PMVA solution [PEG-PMVA concentration 2 or 20 mg/ml, medium PBS (pH 6.0)] were mixed and the mixture allowed to stand for 24 hours at 25 °C to give the title complex.

Comparative Example 3

Preparation of a complex comprising a polymeric modifier and OCIF protein using poly(PEG₃₀₀-MA) as the polymeric modifier

2.2 µl of a dimethylsulfoxide solution containing poly(PEG₃₀₀-MA) [AM-0530K, manufactured by NOF Corporation (hereinafter referred to as "poly(PEG₃₀₀-MA)"] (polymer concentration 35 to 350 mg/ml) were added to 28.4 µl of an aqueous solution of purified human OCIF (OCIF prepared as described in WO 96/26217 and EP 816380) (protein concentration 3.5 mg/ml, medium 0.5M NaH₂PO₄ aqueous solution, the pH of which was adjusted to 7.6 with 5M NaOH aqueous solution), and the solution thus obtained (OCIF concentration 3.2 mg/ml, poly(PEG₃₀₀-MA) concentration 2.5 mg/ml or 6.3 mg/ml) was shaken at 25°C for 40 hours. At the end of this time, the solution was diluted with PBS (pH 7.0) to obtain a solution of OCIF modified with the polymeric modifier having an OCIF concentration of 0.25 mg/ml. The solution thus prepared was stored at 4°C.

Test Example 1

Measurement of carboxyl group content of the polymers of Examples 10 to 13 by conductometric titration

The carboxyl group content of each of the polymers [poly(PEG₃₀₀-MA)_a (Compound Nos. 9 and 10), poly(PEG₃₀₀-MA)_{dma} (Compound No. 11) and poly(PEG₃₀₀-MA)_h (Compound No. 12)] prepared in Examples 10 to 13 was determined by conductometric titration method as follows.

First, each of the polymers was purified using gel filtration as follows. For each polymer, 100 mg of the polymer were dissolved in 4 ml of 0.001 N sodium

hydroxide solution. The solution was divided into four batches and each 1 ml batch was applied to a gel filtration column (PD-10, manufactured by Amersham-Pharmacia). The first 1 ml of eluant was discarded. 1.5 ml of 0.001 N sodium hydroxide solution were then applied to each column and a further 1.5 ml were eluted from the column and discarded. 2.5 ml of 0.001 N sodium hydroxide solution were then applied to each column and a further 2.5 ml were eluted from the column and it is this fraction that contained the purified compound. The purified fractions from the four columns were combined to give a purified solution of the title compounds. The yield after the purification step (determined spectrophotometrically by measuring the absorbance of poly(PEG₃₀₀-MA)_h at 210 nm before and after purification) was determined to be 80% and the concentration in the purified solution was determined to be 8 mg/ml.

For each of the solutions of purified polymer, an aliquot (2.5 to 7.5 ml) was made up to 50 ml with distilled water or 0.01M aqueous sodium hydroxide solution, and then a 1M aqueous sodium hydroxide solution was added to the resulting solution to adjust the pH to 12. 0.1M hydrochloric acid was then added to the solution either in increments of 0.1 ml or continuously at a rate of 0.1 ml/min. In the former, the pH and conductivity were measured after each addition, and in the latter they were measured every 15 seconds. The carboxyl group content of the polymer was then calculated from the amount of 0.1M hydrochloric acid added in the conductivity buffering region (corresponding to a pH range of about 10 to 5.5). The results are shown in Table 5 below.

25

Table 5

Example Number	Kind of polymer (and Compd No.)	Carboxyl group content (mmol/g polymer)	Ammonolysis/aminolysis rate (%)	Hydrolysis Ratio
10	poly(PEG ₃₀₀ -MA) _a (9)	2.10	69	3.169
11	Poly(PEG ₃₀₀ -MA) _a (10)	1.83	86	1.486
12	Poly(PEG ₃₀₀ -MA) _{dma} (11)	2.02	71	2.971
13	Poly(PEG ₃₀₀ -MA) _h (12)	3.21	-	10.0

For the polymers of Examples 10 to 12, the ratio of maleic anhydride residues in the starting material subjected to ammonolysis or aminolysis to maleic anhydride residues subjected to hydrolysis for each was determined by calculation as follows. As shown in Table 5 above, the carboxyl group content per 1 g of poly(PEG₃₀₀-MA)_h (Compound No. 12) is 3.21 mmols. From these values, the weight of poly(PEG₃₀₀-MA) (that is, the weight of the copolymer before hydrolysis) per gram of functional group, and the weight of poly(PEG₃₀₀-MA)_a (Compound Nos. 9 and 10) obtained by adding ammonia to poly(PEG₃₀₀-MA) per gram of functional group were determined. Specifically, the weight of poly(PEG₃₀₀-MA) (that is, the weight of the copolymer before hydrolysis) per mol of maleic anhydride residue was obtained by subtracting the molecular weight of a molecule of water (18 g) from the weight of the fully hydrolysed copolymer, giving a figure of 605 g. The weight of poly(PEG₃₀₀-MA)_a (Compound Nos. 9 and 10) per mol of carboxyl group was obtained by adding the molecular weight of a molecule of ammonia (17 g) to the weight of poly(PEG₃₀₀-MA), giving a figure of 622 g. From this value, the theoretical carboxyl group content per 1 g of poly(PEG₃₀₀-MA)_a (Compound Nos. 9 and 10) where all maleic anhydride residues have been subjected to ammonolysis (i.e. no hydrolysis) was determined by calculation (1 g/622), and was found to be 1.61 mmols. In the same manner, the weight of poly(PEG₃₀₀-MA)_{dma} (Compound No. 11) obtained by adding dimethylamine to poly(PEG₃₀₀-MA) per mol of carboxyl group was determined by adding the molecular weight of a molecule of dimethylamine to the weight of poly(PEG₃₀₀-MA), giving a figure of 650 g. From this value, the theoretical carboxyl group content per 1 g of poly(PEG₃₀₀-MA)_{dma} where all maleic anhydride residues have been subjected to aminolysis by dimethylamine was determined by calculation, and was found to be 1.54 mmols.

For each of the polymers of Examples 10 to 12, the hydrolysis ratio (the percentage of the starting material subjected to hydrolysis compared to ammonolysis or aminolysis) and the ammonolysis or aminolysis reaction rate (%) was determined from the carboxyl group content per 1 g of poly(PEG₃₀₀-MA)_h (Compound No. 11) where all maleic anhydride residues have been subjected to hydrolysis, the theoretical carboxyl group content per 1 g of poly(PEG₃₀₀-MA)_a (Compound Nos. 9 and 10) where all maleic anhydride residues have been subjected to ammonolysis, the theoretical carboxyl group content per 1 g of poly(PEG₃₀₀-MA)_{dma} (Compound No

11) where all maleic anhydride residues have been subjected to aminolysis by dimethylamine, and the actual measured carboxyl group contents per 1 g of each for each of the polymers of Examples 10 to 12 measured by conductometric titration above. The results are as shown in Table 5 above.

5

Test Example 2

Evaluation of retention of OCIF-modifier complexes in the blood using rat

Each of the samples prepared as described in Example 9, Comparative Example 2 and non-modified purified human OCIF (OCIF prepared as described in WO 96/26217 and EP 816380) was appropriately diluted with PBS (pH 6.0) so that the OCIF concentration was 0.25 mg/ml. Each of the diluted samples thus obtained was administered to the tail of a five-week old Wistar female rat (having a body weight of about 100 g and which had abstained from food for one day) via a vein so that the OCIF dose was 0.5 mg/kg (2 ml/kg by volume). 6 hours after administration, 200 µl of blood were taken from the heart of the rat, and then the OCIF concentration in blood serum was measured by an ELISA method, the conditions used being as described in Test Example 3 below

The OCIF concentration in the blood serum measured after the administration of each sample is shown in Table 6 below

Table 6
OCIF concentration in blood serum after intravenous administration of each
OCIF sample

Modifier (and Compound No)	Modifier/ OCIF (weight ratio)	OCIF concentration in blood serum 6 hours after administration (ng/ml)	Conditions at mixing*
Non-modified OCIF	-	25 ± 19	-
PEG-PMVMA	1	101 ± 26	-
	10	361 ± 33	-
poly(PEG ₁₅₀₀ -MA)h (2)	10	502 ± 70	-
poly(PEG ₁₅₀₀ -MA)a (7)	10	1029 ± 30	-
poly(PEG ₁₅₀₀ -MA)dma (8)	1	2145 ± 721	-
poly(PEG ₃₀₀ -MA)h (1)	10	750 ± 80	-
	2.5	434 ± 92	-
poly(PEG ₃₀₀ -MA)a (3)	10	3416 ± 440	-
	10	2445 ± 195	37°C
	2.5	3428 ± 27	-
	2.5	484 ± 92	1 hour
	1	3004 ± 158	-
	1	2275 ± 130	pH 7.4
	1	3786 ± 461	40 hours
	1	777 ± 153	4°C
	0.5	2951 ± 512	-
poly(PEG ₅₀₀ -MA)dma (4)	1	1014 ± 331	-

5 * Basic conditions at mixing were OCIF concentration of 1 mg/ml, pH 6.0, 16 hours,
and 25°C. Only the conditions different from these are given in Table 6.

10 It will be readily appreciated from Table 6 above that each of the complexes of
polymeric modifier and protein of the present invention significantly improved the
retention of the protein in the blood when compared to the retention of protein when

administered alone. It can also be seen by comparison of the prior art complex of PEG-PMVMA and protein (disclosed in Japanese Patent Laid-open No. Hei 11-302199 and prepared in Comparative Example 2 above) and the complexes of the present invention having the same weight ratio between the modifier and protein (1 or 10), that the complexes of modifier and protein of the present invention gave considerably improved retention of the protein in the blood compared to the prior art complex of PEG-PMVMA and protein

Test Example 3

Evaluation of detection rate of OCIF by ELISA

One of the problems encountered with prior art protein modifiers is that binding of the modifiers to the protein causes modification of the protein structure and/or shielding of the protein due to the formation of bulky complexes. In order to test the OCIF-modifier complexes of the present invention, the detection rate of each of the complexes prepared as described in Example 1 and Comparative Example 2 was determined on the basis of non-modified purified human OCIF (OCIF prepared as described in WO 96/26217 and EP 816330) by ELISA. ELISA was carried out as follows

Anti-human OCIF monoclonal antibody OI-19 (prepared according to the method disclosed in EP0974671) was dissolved in a 0.1M sodium acid carbonate solution (pH 9.6) to obtain a solution having an OI-19 concentration of 10 µg/ml. 100 µl of the OI-19 solution thus prepared were placed in each well of a 96-well immunoplate (manufactured by Nunc), and the plates were allowed to stand at 4°C overnight. At the end of this time, 50 % Block Ace (purchased from Snow Brand Milk Products Co., Ltd.) was added to each well to block, and then the plates were washed three times with PBS (washing buffer) containing 0.1 % Tween 20. Purified human OCIF (OCIF prepared as described in WO 96/26217 and EP 816380) was dissolved in primary reaction buffer (that is, 0.2M Tris hydrochloric acid buffer solution (pH 7.4) containing 40 % Block Ace, 0.1 % Tween 20 and 10 µg/ml of Mouse IgG) to prepare standard solutions with various OCIF concentrations. 100 µl of each of the thus prepared solutions with various OCIF concentrations were added

to each well, the plates were shaken at room temperature for 2 hours and then each well was washed six times with the washing buffer. POD-OI-4 (that is, an antibody labeled with peroxidase and recognizing OCIF, prepared as described in EP 0974671) was then diluted 10,000-fold with secondary reaction buffer (that is, 0.1M tris hydrochloric acid buffer solution (pH 7.4) containing 25 % Block Ace, 0.1 % Tween 20 and 10 µg/ml of Mouse IgG), 100 µl of the resulting solution were added to each well, the plates were shaken at room temperature for 2 hours and then each well was washed six times. Once this had been done, 100 µl of a substrate solution (TMB soluble reagent, available from Scytex) were added to each well, and the plates were shaken at room temperature for 10 to 15 minutes. Thereafter, 100 µl of a reaction stopping reagent (TMB stop buffer, available from Scytex) were added to each well and the plates were gently shaken. At the end of this time, the absorbance at a wavelength of 450 nm for each well was measured by a microplate reader (MEML 001, manufactured by Molecular Device corporation). From these results a calibration curve was produced of OCIF concentration against absorbance. Having produced this calibration curve, the procedure was repeated for each of the tested complexes of OCIF and modifier, 100 µl of each of the solutions containing a test complex being added to each well, reaction with POD-OI-4 being performed in the same manner as above and then absorbance at a wavelength of 450 nm for each well being measured by a microplate reader. Comparison of the absorbances obtained with the calibration curve enabled the OCIF concentration detectable by ELISA in each of the complexes to be measured.

For each of the samples, the rate of failure to detect OCIF by ELISA was calculated and the results are as shown in Table 7 below. The rate of failure to detect OCIF by ELISA is defined by the following equation:

$$\text{Rate} = [1 - (\text{OCIF concentration measured by ELISA}) / (\text{OCIF concentration measured by the Lowry method})] \times 100$$

In the above equation, the Lowry method to measure OCIF concentration in the complexes is determined as described in Japanese Patent Application No. 2002-190407. This gives a measure of the total OCIF concentration in the complexes. The

rate of failure to detect OCIF by ELISA in the complex is a measure of the change of conformation of the OCIF caused by complexing with the modifier. A low rate of failure is evidence that the OCIF in the complex can be readily bound by both OI-19 and OI-4 anti-OCIF antibodies, thus showing little or no modification of the OCIF structure in the complex.

Table 7
Rate of failure to detect OCIF sample by ELISA

Modifier (and Compound No)	Modifier/OCIF (weight ratio)	Rate of failure to detect OCIF by ELISA (%) (on the basis of non- modified OCIF)
OCIF	-	-
PEG-PMVMA	1	25
	10	39
poly(PEG ₁₅₀₀ -MA) _h (2)	10	13
poly(PEG ₁₅₀₀ -MA) _a (7)	10	15
poly(PEG ₁₅₀₀ -MA) _{dma} (8)	10	0
poly(PEG ₅₀₀ -MA) _h (1)	10	17
poly(PEG ₅₀₀ -MA) _a (3)	10	0
	2.5	0
Poly(PEG ₅₀₀ -MA) _{dma} (4)	1	12

From the results shown in Table 7 above it can be seen that, for the complexes of polymeric modifier and protein of the present invention, the rate of failure to detect OCIF by ELISA as a result of modification of the protein structure was significantly decreased compared to the high rate that was obtained in the case of the prior art complex of PEG-PMVMA and protein prepared in Test Example 2 above.

From the results of Test Examples 2 and 3, it was thus confirmed that the decrease in protein detection sensitivity caused by excessive modification of the protein for the complexes of polymeric modifier and protein of the present invention

is very low and, furthermore, the retention in blood of the protein in said complexes is significantly better than achieved with prior art complexes.

Test Example 4

5 Measurement of OCIF concentration in blood

Each of the samples prepared as described in Example 9 and purified human OCIF (OCIF prepared as described in WO 96/26217 and EP 816380) is appropriately diluted with PBS (having a pH of 6.0 to 7.4) so that the OCIF concentration is 0.1 to 1 mg/mL. Each of the thus prepared diluted samples is then administered to a six- or
10 seven-year-old female cynomolgus monkey (having a body weight of 2 to 4 kg and which had abstained from food for one day) via the saphenous vein or subcutaneously dorsally to administer an OCIF dose of 0.1 to 1 mg/kg (1 mL/kg by volume). At a predetermined period of time in the range of from five minutes to one month after
15 administration, 500 μ L of blood is taken from the femoral blood vessel thereof, and the OCIF concentration in the blood serum is measured by the ELISA method described in Test Example 3 above.

Test Example 5

20 Measurement of bone density

Each of the samples prepared as described in Example 9 and purified human OCIF (OCIF prepared as described in WO 96/26217 and EP 816380) is appropriately diluted with PBS (having a pH of 6.0 to 7.4) so that the OCIF concentration is in the
25 range of from 0.7 to 3.5 mg/mL. An adjuvant is then prepared using killed cells of *Mycobacterium butylicum* and liquid paraffin, and is injected in the skin of the root of the tail of a 5- to 10-week-old female Lewis rat to give rise to arthritis in said rat. Two weeks after injection of the adjuvant, each of the prepared samples is administered to the rat via the tail vein or subcutaneously dorsally so that the OCIF
30 dose is 1.4 to 7 mg/kg (2 mL/kg by volume). Three weeks after injection of the adjuvant, the rat was dissected to extract the right-and-left thighbone, and the bone density thereof was measured.

Test Example 6**Evaluation of molecular size by SDS polyacrylamide gel electrophoresis under non-reducing conditions**

- 5 The molecular size of each of the complexes of polymeric modifier and OCIF prepared as described in Example 14 and Comparative Example 3 and purified human OCIF (OCIF prepared as described in WO 96/26217 and EP 816380) was evaluated by SDS-PAGE under non-reducing conditions as follows
- 10 5 μ l of NuPAGE (trade mark) LDS Sample Buffer (4X) (obtained from Invitrogen Life Technology) and 5 μ l of purified water were added to 10 μ l of each of the tested samples [which were diluted if necessary with phosphate buffer saline (PBS (pH 7.0), which is a buffer solution obtained by mixing a solution containing 10 mM disodium hydrogenphosphate and 150 mM sodium chloride and a solution containing
- 15 10 mM sodium dihydrogenphosphate and 150 mM sodium chloride at an appropriate volume ratio to give a buffer pH of 7.0) so that the protein concentration was 250 μ g/ml] and each of the resulting solutions was heated at 95°C for 7 minutes. At the end of this time, the full amount of the reaction mixture was added to a SDS-polyacrylamide electrophoresis gel (3 to 8 % Tris-Acetate gel having a thickness of 1
- 20 mm and manufactured by NOVEX), and a voltage of 150 V was applied to the gel using a power supply device (PhoreStar Pro, manufactured by Anatech). After completion of electrophoresis, protein on the gel was stained with Coomassie blue according to a method well known to those skilled in the art.
- 25 As can be seen from in Figs. 1 and 2, OCIF modified with the polymeric modifier of the present invention was stably detected as a substance having a molecular weight higher than that of non-modified OCIF (120kD) at all mixing ratios (a primary band of 130 to 150 kD and a secondary band of 180 to 200 kD were detected on the basis of the molecular weight markers), and furthermore no complex
- 30 having a molecular weight exceeding 210 kD was detected. Similar results (not shown) were also obtained for other polymeric modifiers of the present invention which were the products of aminolysis and alcoholysis. On the other hand, as can be seen in Fig. 3, in the case of OCIF modified with the conventional polymeric modifier

poly(PEG₃₀₀-MA) prepared in Comparative Example 3, the amount of bulky complex obtained is markedly increased as the ratio of the modifier is increased

This result shows that by using the polymeric modifier of the present invention, it is possible to markedly suppress the formation of bulky complexes which are not pharmaceutically preferable and to prepare a complex of polymeric modifier and protein which has stable properties irrespective of the mixing ratio, when compared with the structurally quite similar polymeric modifier poly(PEG₃₀₀-MA) of the prior art.

Test Example 7

Evaluation of covalent bond formation activity of poly(PEG₃₀₀-MA)a

The reactivity of each of the polymeric modifiers poly(PEG₃₀₀-MA)a (Compound No. 9) and poly(PEG₃₀₀-MA)h (Compound No. 12) to tetramethylrhodamine cadaverine, which is a fluorescent substance having an amino group and a molecular weight of 514.62 (available from Molecular Probes, Inc.) (hereinafter referred to as "Rho-NH₂") was determined, and the covalent bond formation activity of the modifiers was evaluated by comparing the reactivity of the two polymeric modifiers as follows

3.8 μ l of solutions of each of poly(PEG₃₀₀-MA)h (Compound No. 12) (prepared as described in Example 13 above) and poly(PEG₃₀₀-MA)a (Compound No. 9) [polymer concentration 21 mg/ml, medium PBS (pH was adjusted with 1M NaOH to 9.5)] (prepared as described in Example 10 above) were added to 18.9 μ l of PBS (pH 6.0) containing 1.08 mg/ml Rho-NH₂. The solutions thus obtained were allowed to stand at 25°C for 3 days. At the end of this time, the reaction mixtures were fractionated by gel filtration chromatography (column PD-10 manufactured by Amersham Biotech, mobile phase purified water) as follows. 0.5 ml of the reaction mixture were applied to the gel filtration column and 0.5 ml run off the column and discarded. 2 ml of distilled water were added to the column and a further 2 ml were eluted and discarded. A further 2 ml of distilled water were added to the column and a further 2 ml were eluted and this fraction contained the polymer fraction Rho-NH₂.

contained in the polymer fractions was quantified by fluorescence spectrometry (excitation wavelength 544 nm, fluorescent wavelength 571 nm, medium purified water adjusted to pH 3), to calculate the ratio of the amount of Rho-NH₂ contained in each complex of polymer and Rho-NH₂ with respect to the total amount of Rho-NH₂ in the reaction mixture, i.e. the binding ratio of Rho-NH₂ to the polymer

The results were as shown in Table 8 below

10

Table 8

Reactivity of polymeric modifier

	Binding ratio of Rho-NH ₂ to polymer* (%)
Rho-NH ₂ + poly(PEG ₅₀₀ -MA)a	11.5, 12.6
Rho-NH ₂ + poly(PEG ₅₀₀ -MA)h	0.8, 1.6
Rho-NH ₂ alone	0, 0

* This test was carried out twice

15 It can be readily seen from Table 8 above that for the reaction mixture of the polymeric modifier poly(PEG₅₀₀-MA)a (Compound No. 9) with Rho-NH₂, there is quite a high level of Rho-NH₂ detected in the polymer fraction. This is in contrast with the reaction mixture of the polymeric modifier poly(PEG₅₀₀-MA)h (Compound No. 12) with Rho-NH₂, where there is only a low level of Rho-NH₂ detected in the polymer fraction. When Rho-NH₂ alone was applied to the column, no Rho-NH₂ was eluted in the "polymer fraction". These results indicate that the polymeric modifier poly(PEG₅₀₀-MA)a (Compound No. 9) of the present invention binds strongly to the amino group of the Rho-NH₂. On the other hand, the binding ratio of the polymeric modifier poly(PEG₅₀₀-MA)h (Compound No. 12) of the present invention is low

20

25 suggesting that this polymeric modifier is not strongly bound to the amino group of the Rho-NH₂

Test Example 8**Evaluation of detection rate of OCIF by ELISA**

5 The detection rate of each of the complexes of OCIF and polymeric modifier prepared as described in Example 14 and Comparative Example 3 above was determined on the basis of non-modified purified human OCIF (OCIF prepared as described in WO 96/26217 and EP 816380) by ELISA. ELISA was carried out as follows

10 Anti-human OCIF monoclonal antibody OI-19 (prepared according to the method disclosed in EP0974671) was dissolved in a 0.1M sodium acid carbonate solution (pH 9.6) to obtain a solution having an OI-19 concentration of 10 µg/ml. 100 µl of the OI-19 solution thus prepared were placed in each well of a 96-well immunoplate (manufactured by Nunc), and the plates were allowed to stand at 4°C overnight. At the end of this time, 50 % Block Ace (purchased from Snow Brand Milk Products Co., Ltd.) was added to each well to block, and then the plates were washed three times with PBS (washing buffer) containing 0.1 % Tween 20. Purified human OCIF (OCIF prepared as described in WO 96/26217 and EP 816380) was dissolved in primary reaction buffer (that is, 0.2M tris hydrochloric acid buffer solution (pH 7.4) containing 40 % Block Ace, 0.1 % Tween 20 and 10 µg/ml of Mouse IgG) to prepare standard solutions with various OCIF concentrations. 100 µl of each of the thus prepared solutions with various OCIF concentrations were added to each well, the plates were shaken at room temperature for 2 hours and then each well was washed six times with the washing buffer. POD-OI-4 (that is, an antibody labeled with peroxidase and recognizing OCIF, prepared as described in EP0974671) was then diluted 10,000-fold with secondary reaction buffer (that is, 0.1M tris hydrochloric acid buffer solution (pH 7.4) containing 25 % Block Ace, 0.1 % Tween 20 and 10 µg/ml of Mouse IgG), 100 µl of the resulting solution were added to each well, the plates were shaken at room temperature for 2 hours and then each well was washed six times. Once this had been done, 100 µl of a substrate solution (TMB soluble reagent, available from Scytek) were added to each well, and the plates were shaken at room temperature for 10 to 15 minutes. Thereafter, 100 µl of a reaction stopping reagent (TMB stop buffer, available from Scytek) were added to each well

and the plates were gently shaken. At the end of this time, the absorbance at a wavelength of 450 nm for each well was measured by a microplate reader (MEML 001, manufactured by Molecular Device corporation). The OCIF concentration of each standard OCIF sample was calculated based on the calibration curve produced using OCIF solutions having a known concentration.

For each of the samples of the tested complex, the absorbances were measured, the OCIF concentrations calculated from the standard curve and the rate of failure to detect OCIF by ELISA was calculated as explained in Test Example 3 above. The results obtained are as shown in Table 9 below.

Table 9
Rate of failure to detect OCIF sample by ELISA

Modifier (and Compound No)	Modifier/OCIF (weight ratio)	Rate of failure to detect OCIF by ELISA (%) (on the basis of non- modified OCIF)
OCIF alone	-	-
poly(PEG ₃₀₀ -MA)h (12)	1	8
poly(PEG ₃₀₀ -MA)a-Na salt (9)	1	0
	0.75	0
	0.5	0
	0.25	0
poly(PEG ₃₀₀ -MA)	7.8	98
	1.9	89
	0.78	60

It can be readily seen from Table 9 above that, for each of the complexes of polymeric modifier and protein of the present invention prepared in Example 14, the rate of failure to detect OCIF by ELISA caused by modification of protein was significantly decreased compared to the prior art complex of polymer and protein prepared in Comparative Example 3, for which the rate of failure to detect OCIF by ELISA was very high.

From these results, it is clear that the complexes of polymeric modifier and protein of the present invention give only a very small decrease in the detection sensitivity by ELISA that can be caused by excess modification of protein and/or formation of a bulky complex

5

Test Example 9

Evaluation of retention in blood using rat

Each of the samples prepared in Example 14 and non-modified purified human OCIF (OCIF prepared as described in WO 96/26217 and EP 816380) was appropriately diluted with PBS (pH 7.0) so that the OCIF concentration was 0.25 or 0.025 mg/mL. Each of the diluted samples thus obtained was administered to a five-week-old Wistar female rat (having a body weight of about 100 g that had abstained from food for one day) via a femoral vein so that the OCIF dose was 0.5 or 0.05 mg/kg (2 mL/kg by volume). 6 hours after administration, 200 μ L of blood were taken from the jugular vein of the rat, and then the OCIF concentration in the blood serum was measured by the ELISA method described above

The OCIF concentration in blood serum measured after the administration of each sample is shown in Table 10 below

20

Table 10

OCIF concentration in blood serum after intravenous administration
of each OCIF sample

Modifier (and Compound No)	Modifier/O CIF (weight ratio)	Dosage (mg/kg)	OCIF concentration in blood serum 6 hours after administration (ng/ml)
OCIF alone	-	0.5	18
poly(PEG ₅₀₀ -MA) _h (12)	1	0.05	127
poly(PEG ₅₀₀ -MA) _a -Na salt (9)	1	0.05	603
	1	0.5	5,549
	0.75	0.5	4,770
	0.5	0.5	4,292
	0.25	0.5	3,020

5

As is apparent from Table 10 above, the complex of polymeric modifier and protein of the present invention significantly improved the retention of said protein in the blood when compared to when the protein alone was administered.

10

From the results above, it is clear that the complex of polymeric modifier and protein of the present invention can be stably produced under wide-ranging conditions and that said complex significantly improves the retention in blood of the protein of the complex after administration. The complex is therefore likely to be extremely useful in pharmaceutical and biochemical fields.

15

Test Example 10

Evaluation of retention in blood using rat

Each of the samples prepared in Example 17 and Example 19 was evaluated in the same manner as in Test Example 9. The OCIF concentration in blood serum measured after administration of each sample is shown in Table 11 below.

20

Table 11
OCIF concentration in blood serum after intravenous
administration of each OCIF sample

Example Number	Modifier (and Compound No)	Fraction	Modifier/ OCIF (weight ratio)	Dosage (mg/kg)	OCIF concentration in blood serum after 6 hours from administration (ng/ml)
17	poly(PEG ₃₀₀ -MA) _n -Na				
	14	SRF55-60	1	0.05	437
	14		2.5	0.05	460
	15	SRF60-65	1	0.05	478
	19	SDF60-70	1	0.5	4,255
17	poly(PEG ₁₅₀₀ -MA) _n				
	21	SRF55-60	1	0.5	256
	21		2.5	0.05	334
19	poly(PEG ₃₀₀ -MA) _n				
	27	Non-fractionated	1	0.5	6,138
	28	Non-fractionated	1	0.5	6,713

It can be readily seen from Table 11 above that all of the tested polymeric modifiers of the present invention having various molecular sizes significantly increased the retention in the blood of the protein compared to when the protein alone was administered.

Test Example 11

Evaluation of molecular size by size exclusion chromatography

The molecular size of each of the complexes of polymeric modifier and OCIF prepared in Example 9, Example 14, Example 17 and Example 19 was evaluated by size exclusion chromatography. Test conditions are as shown in Table 12 below.

69

Table 12 Conditions for size exclusion chromatography

Chromatography apparatus	Explorer 10S (Amersham Biotech)
Column	Superdex 200 HR10/30 (Amersham Biotech)
Mobile phase	phosphate buffer saline (8 mM Na ₂ HPO ₄ , 15 mM KH ₂ PO ₄ , 145 mM NaCl, 0.5 g/L NaN ₃)
Analytical temperature	4°C
Wavelength for detection	280 nm
Flow rate of mobile phase	0.6 mL/min

The retention time of the following standard proteins under the above-mentioned conditions are as shown in Table 13 below

5

Table 13 The retention time of each standard protein

Kind of protein	Molecular weight (kD)	Stokes radius (nm)	Retention time (min)
Ferritin	440	6.10	18.41
Aldose	158	4.81	22.48
Ovalbumin	43	3.05	25.19
Ribonuclease	13.7	1.64	29.56

10 From the results of the size exclusion chromatography, the Stokes radius of non-complexed OCIF was determined to be 5.63 nm, and that of each polymeric modifier – OCIF complex of the invention was as determined as follows

Complexes prepared in Example 9:

- 15 poly(PEG₅₀₀-MA)_h (Compound No. 1)-OCIF complexes (Stokes radius ranging from 6.13 nm to 7.32 nm)
- poly(PEG₅₀₀-MA)_a (Compound No. 3)-OCIF complexes (from 6.12 nm to 6.54 nm),
- poly(PEG₅₀₀-MA)_{dms} (Compound No. 4)-OCIF complex (6.39 nm),
- poly(PEG₅₀₀-MA)_{ipa} (Compound No. 5)-OCIF complex (6.26 nm),
- poly(PEG₅₀₀-MA)_{ea} (Compound No. 6)-OCIF complex (6.44 nm),
- 20 poly(PEG₁₅₀₀-MA)_h (Compound No. 2)-OCIF complex (from 6.44 nm to 6.71 nm),

poly(PEG₁₅₀₀-MA)_a (Compound No 7)-OCIF complex (from 6.40 nm to 6.47 nm),

poly(PEG₁₅₀₀-MA)_{dma} (Compound No 8)-OCIF complex (6.55 nm)

5 From these results it is apparent that each of the complexes of the invention had a Stokes radius that was larger by about 1 nm than that of non-complexed OCIF in phosphate buffer saline used as the mobile phase. Further, for each of the samples, a peak derived from non-modified OCIF was not detected, showing the stability of the complexes.

10

The Stokes radii of the other complexes were determined under conditions similar to those described above. The results were as follows

Complexes prepared in Example 14

15 Complexes prepared under the conditions OCIF conc., 5 mg/mL, polymeric modifier conc., ranging from 1.25 mg/ml to 5 mg/ml, pH 7.4, 25 °C; 36 h, medium, phosphate buffered saline (phosphate conc., 10 mM, NaCl conc., 150 mM), were found to have Stokes radii ranging from 6.2 nm to 6.5 nm. Further, for each of the samples, a peak derived from non-modified OCIF was not detected, showing the
20 stability of the complexes.

Complexes prepared in Example 17:

Complexes prepared with incubation conditions OCIF conc., 0.5 mg/ml, polymeric modifier conc., 0.5 mg/ml, pH 6.0, 25 °C; 168 h, medium, phosphate
25 buffered saline (phosphate conc., 10 mM, NaCl conc., 150 mM), were found to have Stokes radii ranging from 6.1 nm to 6.7 nm. Further, for each of the samples, a peak derived from non-modified OCIF was not detected, showing the stability of the complexes

30 Complexes prepared in Example 19:

Complexes with incubation conditions OCIF conc., 5 mg/ml, polymeric modifier conc., 5 mg/ml, pH 5.5, 25 °C, 168 h, medium, phosphate buffered saline (phosphate conc., 10 mM, NaCl conc., 150 mM), were found to have Stokes radii ranging from

6.3 nm to 6.8 nm. Further, for each of the samples, a peak derived from non-modified OCIF was not detected, showing the stability of the complexes.

5 The increase in the Stokes radii of the polymeric modifier – OCIF complexes of the present invention when compared to the non-complexed OCIF can be attributed to the modification of OCIF with the polymeric modifiers of present invention

Test Example 12

10 Evaluation of retention in blood using rat and evaluation of detection rate of OCIF by ELISA

15 The retention in blood and the detection rate of OCIF by ELISA were tested for the complex prepared in Example 22 (complex of Compound No. 54 and OCIF) (incubation temperature 25 °C) in the same manner as described in Test Examples 2 and 3 above. The OCIF-equivalent dose was set to 0.1 mg/kg. The serum concentration of OCIF was found to be 189 ng/ml 6 hours after iv injection of the complex. Thus, it was confirmed that the complexes prepared with poly(PEG₅₀₀-MA) as sodium salt (Compound No. 54) in Example 22 above showed an excellent level of retention in the blood. Furthermore, the decrease in the OCIF detection sensitivity by ELISA due to excessive modification of the protein by the modifier in the complex was found to be very low.

Test Example 13

25 Evaluation of complex size

30 The molecular size of the complexes prepared in Examples 22 (complex of Compound No. 54 and OCIF) and 24 (complex of Compound No. 55 and OCIF) were evaluated by gel filtration chromatography as described in Test Example 11 above. It was found that the molecular size of these complexes showed a high level of uniformity. For the complexes of Compound No. 54 and OCIF complexed at 4 °C, 10 °C and 25 °C the Stokes radii were found to be 6.0 nm, 6.0 nm and 6.0 nm. For the complexes of Compound No. 55 and OCIF, the Stokes radii were 6.4 nm. Each of the complexes prepared in Example 22 and 24 thus had a larger Stokes radius than non-modified purified human OCIF (Stokes radius 5.63 nm).

Preparation Example

A solution containing the complex obtained under sterile conditions in the same manner as described in Example 14 above is freeze-dried to obtain a freeze-dried preparation.

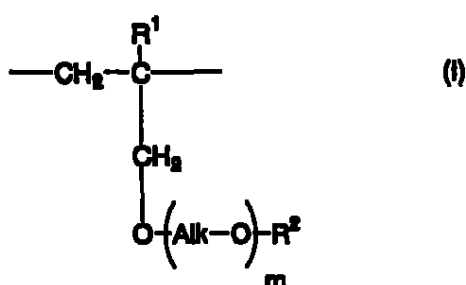
5

71

Claims

1 A copolymer or a pharmacologically acceptable salt thereof, which contains, as constitutional units,

(a) one or more structural units which may be the same or different from each other and which are represented by the formula (I) below



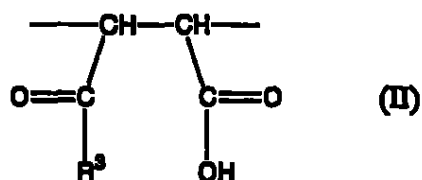
wherein

m is an integer of from 3 to 100,

Alk represents an alkylene group having from 1 to 6 carbon atoms, and

R^1 and R^2 are the same or different and each represents a hydrogen atom or an alkyl group having from 1 to 6 carbon atoms that may optionally be substituted with at least one substituent selected from the group consisting of hydroxy groups, halogen atoms and aryl groups having from 6 to 14 carbon atoms that may optionally be substituted with from 1 to 5 substituents selected from Substituents A defined below, and

(b) one or more structural units which may be the same or different from each other and which are represented by the formula (II)



wherein

R^3 represents

a hydroxyl group,

an alkoxy group having from 1 to 6 carbon atoms that may optionally be substituted with at least one substituent selected from the group consisting of hydroxy groups, halogen atoms and aryl groups having from 6 to 14 carbon atoms that may optionally be substituted with from 1 to 5 substituents selected from Substituents A defined below,

an aryloxy group having from 6 to 14 carbon atoms that may optionally be substituted with from 1 to 5 substituents selected from Substituents A defined below, or

a group represented by the formula $-NR^4R^5$, wherein R^4 and R^5 are the same or different from each other and each represents a hydrogen atom or an alkyl group having from 1 to 6 carbon atoms that may optionally be substituted with at least one substituent selected from the group consisting of hydroxy groups, halogen atoms and aryl groups having from 6 to 14 carbon atoms that may optionally be substituted with from 1 to 5 substituents selected from Substituents A defined below;

Substituents A are selected from alkyl groups having from 1 to 6 carbon atoms, alkoxy groups having from 1 to 6 carbon atoms, halogen atoms, hydroxy groups, nitro groups and carboxy groups.

2 A copolymer or a pharmacologically acceptable salt thereof according to claim 1, wherein the structural units represented by the formula (I) and the structural units represented by the formula (II) are arranged in an alternating head-to-head sequence, an alternating head-to-tail sequence or an alternating mixed sequence of head-to-head and head-to-tail

3 A copolymer or a pharmacologically acceptable salt thereof according to claim 1, wherein the structural units represented by the formula (I) and the structural units represented by the formula (II) are arranged in a random sequence.

4 A copolymer or a pharmacologically acceptable salt thereof according to any one of claims 1 to 3, wherein Alk is an ethylene or trimethylene group

5 A copolymer or a pharmacologically acceptable salt thereof according to claim 4, wherein Alk is an ethylene group

72

- 6 A copolymer or a pharmacologically acceptable salt thereof according to any one of claims 1 to 5, wherein m is an integer of from 3 to 50
- 7 A copolymer or a pharmacologically acceptable salt thereof according to claim 6, wherein m is an integer of from 3 to 40
- 8 A copolymer or a pharmacologically acceptable salt thereof according to claim 7, wherein m is an integer of from 6 to 16 or 28 to 38
- 9 A copolymer or a pharmacologically acceptable salt thereof according to claim 8, wherein m is an integer of from 6 to 16
- 10 A copolymer or a pharmacologically acceptable salt thereof according to any one of claims 1 to 9, wherein R^1 is a hydrogen atom or a methyl group
- 11 A copolymer or a pharmacologically acceptable salt thereof according to claim 10, wherein R^1 is a hydrogen atom
- 12 A copolymer or a pharmacologically acceptable salt thereof according to any one of claims 1 to 11, wherein R^2 is a hydrogen atom or a methyl group
- 13 A copolymer or a pharmacologically acceptable salt thereof according to claim 12, wherein R^2 is a methyl group
- 14 A copolymer or a pharmacologically acceptable salt thereof according to any one of claims 1 to 13, wherein R^3 is a hydroxyl group, an alkoxy group having from 1 to 6 carbon atoms or a group represented by the formula $-NR^4R^5$, wherein R^4 and R^5 are the same or different and each represents a hydrogen atom or an alkyl group having from 1 to 6 carbon atoms.
- 15 A copolymer or a pharmacologically acceptable salt thereof according to claim 14, wherein R^3 is a hydroxyl group or an alkoxy group having from 1 to 6 carbon atoms
-

16. A copolymer or a pharmacologically acceptable salt thereof according to claim 15, comprising at least one structural unit represented by the formula (II) in which R^3 is an alkoxy group having from 1 to 6 carbon atoms and optionally at least one structural unit represented by the formula (II) in which R^3 is a hydroxyl group, wherein the ratio between the structural units represented by the formula (II) in which R^3 is a hydroxy group and the structural units represented by the formula (II) in which R^3 is an alkoxy group having from 1 to 6 carbon atoms is in the range of from 4.6 to 0.10

17. A copolymer or a pharmacologically acceptable salt thereof according to claim 15 or claim 16, wherein R^3 is an alkoxy group having from 1 to 6 carbon atoms

18. A copolymer or a pharmacologically acceptable salt thereof according to any one of claims 15 to 17, wherein said alkoxy group having from 1 to 6 carbon atoms is an ethoxy group

19. A copolymer or a pharmacologically acceptable salt thereof according to claim 14, wherein R^3 is a hydroxyl group or a group represented by the formula $-IP^4P^5$, wherein R^4 and R^5 are the same or different and each represents a hydrogen atom or an alkyl group having from 1 to 6 carbon atoms

20. A copolymer or a pharmacologically acceptable salt thereof according to claim 19, comprising at least one structural unit represented by the formula (II) in which R^3 is a group represented by the formula $-NR^4R^5$, wherein R^4 and R^5 are the same or different and each represents a hydrogen atom or an alkyl group having from 1 to 6 carbon atoms and optionally at least one structural unit represented by the formula (II) in which R^3 is a hydroxyl group, wherein the ratio between the structural units represented by the formula (II) in which R^3 is a hydroxy group and the structural units represented by the formula (II) in which R^3 is a group represented by the formula $-NR^4R^5$ is in the range of from 5.5 to 0.10

21. A copolymer or a pharmacologically acceptable salt thereof according to claim 20, wherein the ratio between the structural units represented by the formula (II) in which R^3 is a hydroxy group and the structural units represented by the formula (II) in

which R^3 is a group represented by the formula $-NR^4R^5$ is in the range of from 4.6 to 0.10

22 A copolymer or a pharmacologically acceptable salt thereof according to any one of claims 19 to 21, wherein R^3 is a group represented by the formula $-NR^4R^5$, wherein R^4 and R^5 are the same or different and each represents a hydrogen atom or an alkyl group having from 1 to 6 carbon atoms

23 A copolymer or a pharmacologically acceptable salt thereof according to any one of claims 19 to 22, wherein the group represented by the formula $-NR^4R^5$ is an amino group, a methylamino group or a dimethylamino group

24 A copolymer or a pharmacologically acceptable salt thereof according to claim 23, wherein the group represented by the formula $-NR^4R^5$ is an amino group

25 A copolymer or a pharmacologically acceptable salt thereof according to claim 23, wherein the group represented by the formula $-NR^4R^5$ is a dimethylamino group

26 A copolymer or a pharmacologically acceptable salt thereof according to claim 14, wherein R^3 is a hydroxyl group

27 A copolymer or a pharmacologically acceptable salt thereof according to claim 14, wherein R^3 is a 1-amino-2-propanol group

28 A copolymer or a pharmacologically acceptable salt thereof according to any one of claims 1 to 27, wherein the ratio between the structural unit represented by the formula (I) and the structural unit represented by the formula (II) is in the range of from 10.1 to 1.10

29 A copolymer or a pharmacologically acceptable salt thereof according to claim 28, wherein the ratio between the structural unit represented by the formula (I) and the structural unit represented by the formula (II) is in the range of from 3.1 to 1.8

- 30 A copolymer or a pharmacologically acceptable salt thereof according to claim 28, wherein the ratio between the structural unit represented by the formula (I) and the structural unit represented by the formula (II) is in the range of from 2/1 to 1/2 or 1/2 to 1/6
- 31 A copolymer or a pharmacologically acceptable salt thereof according to claim 28, wherein the ratio between the structural unit represented by the formula (I) and the structural unit represented by the formula (II) is 1/1 or in the range of from 1/2 to 1/4
- 32 A copolymer or a pharmacologically acceptable salt thereof according to any one of claims 1 to 31, wherein the average degree of polymerization is in the range of from 5 to 200
- 33 A copolymer or a pharmacologically acceptable salt thereof according to claim 32, wherein the average degree of polymerization is in the range of from 5 to 50
- 34 A copolymer or a pharmacologically acceptable salt thereof according to claim 33, wherein the average degree of polymerization is in the range of from 5 to 20
- 35 A copolymer or a pharmacologically acceptable salt thereof according to claim 32, wherein the average degree of polymerization is in the range of from 20 to 30
- 36 A copolymer or a pharmacologically acceptable salt thereof according to claim 32, wherein the average degree of polymerization is in the range of from 30 to 40
- 37 A copolymer or a pharmacologically acceptable salt thereof according to any one of claims 1 to 31, wherein the Stokes radius thereof is 9.3 nm or less
- 38 A copolymer or a pharmacologically acceptable salt thereof according to claim 37, wherein the Stokes radius thereof is 7.3 nm or less.
- 39 A copolymer or a pharmacologically acceptable salt thereof according to claim 38, wherein the Stokes radius thereof is 6.2 nm or less

40 A copolymer or a pharmacologically acceptable salt thereof according to claim 39, wherein the Stokes radius thereof is 4.7 nm or less

41 A copolymer or a pharmacologically acceptable salt thereof according to claim 40, wherein the Stokes radius thereof is 3.1 nm or less

42 A copolymer or a pharmacologically acceptable salt thereof according to claim 37, wherein the Stokes radius thereof is in the range of from 1.5 nm to 4.7 nm

43 A copolymer or a pharmacologically acceptable salt thereof according to claim 37, wherein the Stokes radius thereof is in the range of from 3.1 nm to 6.2 nm.

44 A copolymer according or a pharmacologically acceptable salt thereof according to claim 1 wherein

m is an integer of from 3 to 100,

Alk represents an alkylene group having from 1 to 6 carbon atoms,

R¹ and R² are the same or different and each represents a hydrogen atom or an alkyl group having from 1 to 6 carbon atoms, and

R³ represents a hydroxyl group, an alkoxy group having from 1 to 6 carbon atoms that may optionally be substituted with one hydroxy group, or a group represented by the formula -NR⁴R⁵, wherein R⁴ and R⁵ are the same or different from each other and each represents a hydrogen atom or an alkyl group having from 1 to 6 carbon atoms that may optionally be substituted with one hydroxy group.

45 A copolymer or a pharmacologically acceptable salt thereof according to claim 1, wherein Alk represents an ethylene group, R¹ represents a hydrogen atom, R² represents a methyl group and m, R³, the ratio of the structural units of formulae (I) and (II) (the composition ratio) and, where relevant, the ratio between the units of formula (II) wherein R³ represents a hydroxy group and the units of formula (II) wherein R³ represents a group other than hydroxy (the hydrolysis ratio) are selected from the following

(i) m is from 6 to 16, R³ is a hydroxy group, the composition ratio is 1:1 and the average degree of polymerisation is from 30 to 40,

- (ii) m is from 28 to 38, R^3 is a hydroxy group, the composition ratio is 1:1 and the average degree of polymerisation is from 10 to 15,
- (iii) m is from 6 to 16, R^3 is an amino group, the composition ratio is 1:1 and the average degree of polymerisation is from 30 to 40;
- (iv) m is from 6 to 16, R^3 is a dimethylamino group, the composition ratio is 1:1 and the average degree of polymerisation is from 30 to 40,
- (v) m is from 6 to 16, R^3 is a 1-amino-2-propanol group, the composition ratio is 1:1 and the average degree of polymerisation is from 30 to 40;
- (vi) m is from 6 to 16, R^3 is selected from ethoxy and hydroxy groups, the composition ratio is 1:1, the average degree of polymerisation is from 30 to 40 and the hydrolysis ratio is 4.6,
- (vii) m is from 28 to 38, R^3 is selected from amino and hydroxy groups, the composition ratio is 1:1, the average degree of polymerisation is from 10 to 15 and the hydrolysis ratio is 4.6,
- (viii) m is from 28 to 38, R^3 is a dimethylamino group, the composition ratio is 1:1 and the average degree of polymerisation is from 10 to 15,
- (ix) m is from 6 to 16, R^3 is selected from amino and hydroxy groups, the composition ratio is 1:1, the average degree of polymerisation is from 30 to 40, the hydrolysis ratio is 3.1:6.9 and the copolymer is a sodium salt,
- (x) m is from 6 to 16, R^3 is selected from amino and hydroxy groups, the composition ratio is 1:1, the average degree of polymerisation is from 30 to 40 and the hydrolysis ratio is 1.4:8.6,
- (xi) m is from 6 to 16, R^3 is selected from dimethylamino and hydroxy groups, the composition ratio is 1:1, the average degree of polymerisation is from 30 to 40, the hydrolysis ratio is 2.9:7.1 and the copolymer is a sodium salt,
- (xii) m is from 6 to 16, R^3 is an amino group, the composition ratio is 1:2.4 and the average degree of polymerisation is from 20 to 30;
- (xiii) m is from 6 to 16, R^3 is selected from amino and hydroxy groups, the composition ratio is 1:2.4, the average degree of polymerisation is from 20 to 30 and the hydrolysis ratio is 0.4:9.6,
- (xiv) m is from 6 to 16, R^3 is selected from amino and hydroxy groups, the composition ratio is 1:2.4, the average degree of polymerisation is from 20 to 30 and the hydrolysis ratio is 2.9:7.1,

75

- (xv) m is from 6 to 16, R^3 is selected from amino and hydroxy groups, the composition ratio is 1 2.4, the average degree of polymerisation is from 20 to 30 and the hydrolysis ratio is 0.9 9 1,
- (xvi) m is from 6 to 16, R^3 is selected from amino and hydroxy groups, the composition ratio is 1 2.4, the average degree of polymerisation is from 20 to 30 and the hydrolysis ratio is 0.5 9 5,
- (xvii) m is from 6 to 16, R^3 is selected from amino and hydroxy groups, the composition ratio is 1 2.4, the average degree of polymerisation is from 20 to 30 and the hydrolysis ratio is 1.3 8 7,
- (xviii) m is from 6 to 16, R^3 is selected from amino and hydroxy groups, the composition ratio is 1 2.4, the average degree of polymerisation is from 20 to 30 and the hydrolysis ratio is 1.9 8 1,
- (xix) m is from 6 to 16, R^3 is selected from amino and hydroxy groups, the composition ratio is 1 2.4, the average degree of polymerisation is from 20 to 30 and the hydrolysis ratio is 1.0 9 0,
- (xx) m is from 6 to 16, R^3 is selected from amino and hydroxy groups, the composition ratio is 1 2.4, the average degree of polymerisation is from 20 to 30 and the hydrolysis ratio is 0.8 9 2,
- (xxi) m is from 6 to 16, R^3 is selected from amino and hydroxy groups, the composition ratio is 1 2.4, the average degree of polymerisation is from 20 to 30 and the hydrolysis ratio is 4.6 5.4,
- (xxii) m is from 6 to 16, R^3 is selected from amino and hydroxy groups, the composition ratio is 1 2.4, the average degree of polymerisation is from 20 to 30 and the hydrolysis ratio is 1.2 8 8,
- (xxiii) m is from 6 to 16, R^3 is selected from amino and hydroxy groups, the composition ratio is 1 2.4, the average degree of polymerisation is from 20 to 30 and the hydrolysis ratio is 2.0 8 0,
- (xxiv) m is from 6 to 16, R^3 is selected from amino and hydroxy groups, the composition ratio is 1 2.4, the average degree of polymerisation is from 20 to 30 and the hydrolysis ratio is 1.1 8 9,
- (xxv) m is from 6 to 16, R^3 is selected from amino and hydroxy groups, the composition ratio is 1 2.4, the average degree of polymerisation is from 20 to 30 and the hydrolysis ratio is 2.4 7 6,

(xxvi) m is from 6 to 16, R^3 is selected from amino and hydroxy groups, the composition ratio is 1:2.4, the average degree of polymerisation is from 20 to 30 and the hydrolysis ratio is 0.991,

(xxvii) m is from 6 to 16, R^3 is selected from amino and hydroxy groups, the composition ratio is 1:2.4, the average degree of polymerisation is from 20 to 30 and the hydrolysis ratio is 1.585,

(xxviii) m is from 6 to 16, R^3 is selected from amino and hydroxy groups, the composition ratio is 1:2.4, the average degree of polymerisation is from 20 to 30 and the hydrolysis ratio is 0.793,

(xxix) m is from 6 to 16, R^3 is selected from amino and hydroxy groups, the composition ratio is 1:2.4, the average degree of polymerisation is from 20 to 30 and the hydrolysis ratio is 4.555,

(xxx) m is from 6 to 16, R^3 is selected from amino and hydroxy groups, the composition ratio is 1:2.4, the average degree of polymerisation is from 20 to 30 and the hydrolysis ratio is 14.86,

(xxxi) m is from 6 to 16, R^3 is selected from amino and hydroxy groups, the composition ratio is 1:2.4, the average degree of polymerisation is from 20 to 30 and the hydrolysis ratio is 0.793,

(xxxii) m is from 6 to 16, R^3 is selected from amino and hydroxy groups, the composition ratio is 1:2.4, the average degree of polymerisation is from 20 to 30 and the hydrolysis ratio is 0.392,

(xxxiii) m is from 6 to 16, R^3 is selected from amino and hydroxy groups, the composition ratio is 1:2.4, the average degree of polymerisation is from 20 to 30 and the hydrolysis ratio is 14.86,

(xxxiv) m is from 6 to 16, R^3 is selected from amino and hydroxy groups, the composition ratio is 1:3.1, the average degree of polymerisation is from 20 to 30 and the hydrolysis ratio is 0.793,

(xxxv) m is from 6 to 16, R^3 is selected from amino and hydroxy groups, the composition ratio is 1:2.4, the average degree of polymerisation is from 20 to 30 and the hydrolysis ratio is 0.991,

(xxxvi) m is from 6 to 16, R^3 is selected from amino and hydroxy groups, the composition ratio is 1:2.4, the average degree of polymerisation is from 20 to 30 and the hydrolysis ratio is 1.981,

76

(xxxvii) m is from 6 to 16, R^3 is selected from ethoxy and hydroxy groups, the composition ratio is about 1/3, the average degree of polymerisation is from 20 to 30 and the hydrolysis ratio is 3/1/6/9,

(xxxviii) m is from 6 to 16, R^3 is selected from amino and hydroxy groups, the composition ratio is 1/1, the hydrolysis ratio is 1/4/8/6 and the Stokes radius is 9.3 nm or less,

(xxxix) m is from 6 to 16, R^3 is selected from amino and hydroxy groups, the composition ratio is 1/1, the hydrolysis ratio is 1/4/8.6 and the Stokes radius is in the range of from 3.1 to 6.2 nm,

(xl) m is from 6 to 16, R^3 is selected from amino and hydroxy groups, the composition ratio is 1/1, the hydrolysis ratio is 1/4/8.6 and the Stokes radius is in the range of from 1.5 to 4.7 nm,

(xli) m is from 6 to 16, R^3 is selected from amino and hydroxy groups, the composition ratio is 1/1, the hydrolysis ratio is 1/4/8/6 and the Stokes radius is 3.1 nm or less;

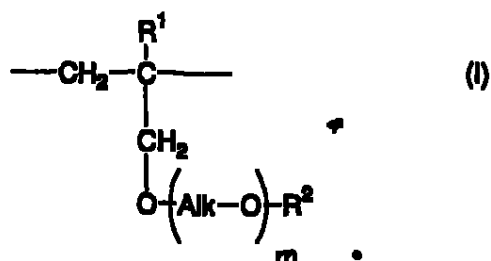
(xlii) m is from 6 to 16, R^3 is selected from amino and hydroxy groups, the composition ratio is 1/1, the hydrolysis ratio is 1/4/8/6 and the Stokes radius is 7.8 nm or less,

(xliii) m is from 6 to 16, R^3 is selected from amino and hydroxy groups, the composition ratio is 1/1, the hydrolysis ratio is 1.4/8/6 and the Stokes radius is 6.2 nm or less, and

(xliv) m is from 6 to 16, R^3 is selected from amino and hydroxy groups, the composition ratio is 1/1, the hydrolysis ratio is 1/4/8/6 and the Stokes radius is 4.7 nm or less

46 A copolymer or a pharmacologically acceptable salt thereof obtainable by subjecting one or more carboxylic anhydride moieties of formula (III) in a copolymer which contains, as constitutional units,

(a) one or more structural units which may be the same or different from each other and which are represented by the formula (I) below



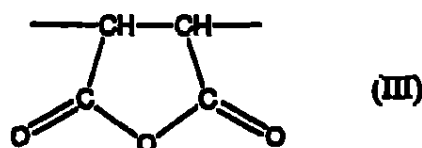
wherein

m is an integer of from 3 to 100,

Alk represents an alkylene group having from 1 to 6 carbon atoms, and

R^1 and R^2 are the same or different and each represents a hydrogen atom or an alkyl group having from 1 to 6 carbon atoms that may optionally be substituted with at least one substituent selected from the group consisting of hydroxy groups, halogen atoms and aryl groups having from 6 to 14 carbon atoms that may optionally be substituted with from 1 to 5 substituents selected from Substituents A defined below, and

(b) said structural unit comprising a carboxylic anhydride moiety of formula (III)



to one or more reactions selected from the group consisting of (i) hydrolysis, (ii) ammonolysis, (iii) aminolysis and (iv) alcoholysis,

Substituents A are selected from alkyl groups having from 1 to 6 carbon atoms, alkoxy groups having from 1 to 6 carbon atoms, halogen atoms, hydroxy groups, nitro groups and carboxy groups

47 A copolymer or a pharmacologically acceptable salt thereof according to claim 46, wherein the structural unit represented by the formula (I) and the structural unit represented by the formula (III) in the copolymer are arranged in an alternating head-to-head sequence, an alternating head-to-tail sequence or an alternating mixed sequence of head-to-head and head-to-tail

77

48 A copolymer or a pharmacologically acceptable salt thereof according to according to claim 46, wherein the structural unit represented by the formula (I) and the structural unit represented by the formula (III) in the copolymer are arranged in random sequence.

49 A copolymer or a pharmacologically acceptable salt thereof according to any one of claims 46 to 48, wherein Alk is an ethylene or trimethylene group.

50 A copolymer or a pharmacologically acceptable salt thereof according to claim 49, wherein Alk is an ethylene group

51 A copolymer or a pharmacologically acceptable salt thereof according to any one of claims 46 to 50, wherein m is an integer of from 3 to 50

52 A copolymer or a pharmacologically acceptable salt thereof according to claim 51, wherein m is an integer of from 3 to 40

53 A copolymer or a pharmacologically acceptable salt thereof according to claim 52, wherein m is an integer of from 6 to 16 or 28 to 38

54 A copolymer or a pharmacologically acceptable salt thereof according to claim 53, wherein m is an integer of from 6 to 16

55 A copolymer or a pharmacologically acceptable salt thereof according to any one of claims 46 to 54, wherein R¹ is a hydrogen atom or a methyl group

56 A copolymer or a pharmacologically acceptable salt thereof according to claim 55, wherein R¹ is a hydrogen atom

57 A copolymer or a pharmacologically acceptable salt thereof according to any one of claims 46 to 56, wherein R² is a hydrogen atom or a methyl group

58 A copolymer or a pharmacologically acceptable salt thereof according to claim 57, wherein R² is a methyl group

59 A copolymer or a pharmacologically acceptable salt thereof according to any one of claims 46 to 58, wherein the ratio between the structural unit represented by the formula (I) and the structural unit obtained by subjecting one or more structural units of formula (III) to one or more reactions selected from the group consisting of (i) hydrolysis, (ii) ammonolysis, (iii) aminolysis and (iv) alcoholysis is in the range of from 10:1 to 1:10

60 A copolymer or a pharmacologically acceptable salt thereof according to claim 59, wherein the ratio between the structural unit represented by the formula (I) and the structural unit obtained by subjecting one or more structural units of formula (III) to one or more reactions selected from the group consisting of (i) hydrolysis, (ii) ammonolysis, (iii) aminolysis and (iv) alcoholysis is in the range of from 3:1 to 1:8

61 A copolymer or a pharmacologically acceptable salt thereof according to claim 59, wherein the ratio between the structural unit represented by the formula (I) and the structural unit obtained by subjecting one or more structural units of formula (III) to one or more reactions selected from the group consisting of (i) hydrolysis, (ii) ammonolysis, (iii) aminolysis and (iv) alcoholysis is in the range of from 2:1 to 1:2 or 1:2 to 1:6

62 A copolymer or a pharmacologically acceptable salt thereof according to claim 59, wherein the ratio between the structural unit represented by the formula (I) and the structural unit obtained by subjecting one or more structural units of formula (III) to one or more reactions selected from the group consisting of (i) hydrolysis, (ii) ammonolysis, (iii) aminolysis and (iv) alcoholysis is 1:1 or in the range of from 1:2 to 1:4.

63 A copolymer or a pharmacologically acceptable salt thereof according to any one of claims 46 to 62, wherein the average degree of polymerization is in the range of from 5 to 200

64 A copolymer or a pharmacologically acceptable salt thereof according to claim 63, wherein the average degree of polymerization is in the range of from 5 to 50

78

65 A copolymer or a pharmacologically acceptable salt thereof according to claim 64, wherein the average degree of polymerization is in the range of from 5 to 20

66 A copolymer or a pharmacologically acceptable salt thereof according to claim 63, wherein the average degree of polymerization is in the range of from 20 to 30

67 A copolymer or a pharmacologically acceptable salt thereof according to claim 63, wherein the average degree of polymerization is in the range of from 30 to 40

68 A copolymer according or a pharmacologically acceptable salt thereof to claim 46 wherein

m is an integer of from 3 to 100,

Alk represents an alkylene group having from 1 to 6 carbon atoms, and

R¹ and R² are the same or different and each represents a hydrogen atom or an alkyl group having from 1 to 6 carbon atoms

69 A copolymer or a pharmacologically acceptable salt thereof according to any one of claims 46 to 63, which is obtainable by subjecting a carboxylic anhydride moiety of formula (III) in the copolymer to ammonolysis

70 A copolymer or a pharmacologically acceptable salt thereof according to claim 69, which is obtainable by carrying out the ammonolysis with ammonia water

71 A copolymer or a pharmacologically acceptable salt thereof according to any one of claims 46 to 68, which is obtainable by subjecting a carboxylic anhydride moiety of formula (III) in the copolymer to aminolysis

72 A copolymer or a pharmacologically acceptable salt thereof according to claim 71, which is obtainable by carrying out the aminolysis using an aqueous dimethylamine solution.

73 A copolymer or a pharmacologically acceptable salt thereof according to any one of claim 46 to 68, which is obtainable by subjecting a carboxylic anhydride moiety of formula (III) in the copolymer to alcoholysis

74. A copolymer or a pharmacologically acceptable salt thereof according to claim 73, which is obtainable by carrying out the alcoholysis using ethanol

75 A pharmaceutical composition comprising a pharmaceutically acceptable diluent or carrier and at least one copolymer or a pharmacologically acceptable salt thereof of the present invention according to any one of claims 1 to 74

76 A pharmaceutical composition according to claim 75, wherein said composition further comprises at least one protein or an analogue or variant thereof.

77 A pharmaceutical composition according to claim 76, wherein the protein or an analogue or variant thereof is a basic protein.

78 A pharmaceutical composition according to claim 77, wherein the basic protein is a basic fibroblast growth factor (bFGF), an epidermal growth factor (EGF), an osteoclastogenesis inhibitory factor (OCIF), a platelet-derived growth factor (PDGF), a brain-derived neurotrophic factor (BDNF), a nerve growth factor (NGF), a human growth hormone (HGH), a hepatocyte growth factor (HGF), or a vascular endothelial growth factor (VEGF), or an analogue or a variant thereof

79 A pharmaceutical composition according to claim 77, wherein the basic protein is an osteoclastogenesis inhibitory factor (OCIF) or an analogue or a variant thereof

80 A pharmaceutical composition according to claim 79, wherein said OCIF or an analogue or variant thereof is natural type or recombinant type OCIF

81 A pharmaceutical composition according to 79, wherein said OCIF or an analogue or variant thereof is a monomer or a dimer

82 A pharmaceutical composition according to claim 79, wherein said OCIF is a monomer of human OCIF having a molecular weight as measured by SDS-PAGE under non-reducing conditions of about 60000 or a dimer of human OCIF having a

molecular weight of about 120000 as measured by SDS-PAGE under non-reducing conditions

83 A pharmaceutical composition according to claim 79, wherein said OCIF comprises amino acids -21 to +380 of SEQ ID NO 1 of the sequence listing.

84 A pharmaceutical composition according to claim 79, wherein said OCIF comprises amino acids +1 to +380 of SEQ ID NO 1 of the sequence listing.

85 A modifier capable of modifying a protein or an analogue or variant thereof, said modifier comprising the copolymer or a pharmacologically acceptable salt thereof according to any one of claims 1 to 74.

86 A modifier capable of modifying a protein or an analogue or variant thereof according to claim 85, wherein the protein is a basic protein.

87 A modifier capable of modifying a protein or an analogue or variant thereof according to claim 86, wherein the basic protein is a basic fibroblast growth factor (bFGF), an epidermal growth factor (EGF), an osteoclastogenesis inhibitory factor (OCIF), a platelet-derived growth factor (PDGF), a brain-derived neurotrophic factor (BDNF), a nerve growth factor (NGF), a human growth hormone (HGH), a hepatocyte growth factor (HGF), or a vascular endothelial growth factor (VEGF), or an analogue or a variant thereof.

88 A modifier capable of modifying a protein or an analogue or variant thereof according to claim 86, wherein the basic protein is an osteoclastogenesis inhibitory factor (OCIF) or an analogue or a variant thereof.

89 A modifier capable of modifying a protein or an analogue or variant thereof according to claim 88, wherein said OCIF or an analogue or variant thereof is natural type or recombinant type OCIF

90. A modifier capable of modifying a protein or an analogue or variant thereof according to claim 88, wherein said OCIF or an analogue or variant thereof is a monomer or a dimer

91 A modifier capable of modifying a protein or an analogue or variant thereof according to claim 88, wherein said OCIF is a monomer of human OCIF having a molecular weight as measured by SDS-PAGE under non-reducing conditions of about 60000 or a dimer of human OCIF having a molecular weight of about 120000 as measured by SDS-PAGE under non-reducing conditions

92 A modifier capable of modifying a protein or an analogue or variant thereof according to claim 88, wherein said OCIF comprises amino acids -21 to +380 of SEQ ID NO 1 of the sequence listing.

93 A modifier capable of modifying a protein or an analogue or variant thereof according to claim 88, wherein said OCIF comprises amino acids +1 to +380 of SEQ ID NO 1 of the sequence listing.

94. A complex comprising at least one protein or an analogue or variant thereof which is bound to at least one copolymer or a pharmacologically acceptable salt thereof according to any one of claims 1 to 74.

95 A complex according to claim 94, wherein the protein is a basic protein

96. A complex according to claim 95, wherein the basic protein is a basic fibroblast growth factor (bFGF), an epidermal growth factor (EGF), an osteoclastogenesis inhibitory factor (OCIF), a platelet-derived growth factor (PDGF), a brain-derived neurotrophic factor (BDNF), a nerve growth factor (NGF), a human growth hormone (HGH), a hepatocyte growth factor (HGF), or a vascular endothelial growth factor (VEGF), or an analogue or a variant thereof.

97 A complex according to claim 95, wherein the basic protein is an osteoclastogenesis inhibitory factor (OCIF) or an analogue or a variant thereof.

- 98 A complex according to claim 97, wherein said OCIF or an analogue or variant thereof is natural type or recombinant type OCIF
- 99 A complex according to claim 97, wherein said OCIF or an analogue or variant thereof is a monomer or a dimer
- 100 A complex according to claim 97, wherein said OCIF is a monomer of human OCIF having a molecular weight as measured by SDS-PAGE under non-reducing conditions of about 60000 or a dimer of human OCIF having a molecular weight of about 120000 as measured by SDS-PAGE under non-reducing conditions
- 101 A complex according to claim 97, wherein said OCIF comprises amino acids – 21 to +380 of SEQ ID NO 1 of the sequence listing.
102. A complex according to claim 97, wherein said OCIF comprises amino acids +1 to +380 of SEQ ID NO 1 of the sequence listing.
- 103 A pharmaceutical composition comprising an effective amount of a pharmacologically active agent together with a carrier or diluent therefor, wherein said pharmacologically active agent is in the form of a complex according to any one of claims 94 to 102.
- 104 A method for prolonging the time that a protein or an analogue or variant thereof is retained in the bloodstream after administration to a patient by complexing said protein or an analogue or variant thereof with at least one copolymer or a pharmacologically acceptable salt thereof according to any one of claims 1 to 74
- 105 A method according to claim 104, wherein the protein is a basic protein
- 106 A method according to claim 105, wherein the basic protein is a basic fibroblast growth factor (bFGF), an epidermal growth factor (EGF), an osteoclastogenesis inhibitory factor (OCIF), a platelet-derived growth factor (PDGF), a brain-derived neurotrophic factor (BDNF), a nerve growth factor (NGF), a human

growth hormone (HGH), a hepatocyte growth factor (HGF), or a vascular endothelial growth factor (VEGF), or an analogue or a variant thereof

107 A method according to claim 105, wherein the basic protein is an osteoclastogenesis inhibitory factor (OCIF) or an analogue or a variant thereof

108. A method according to claim 107, wherein said OCIF or an analogue or variant thereof is natural type or recombinant type OCIF

109 A method according to claim 107, wherein said OCIF or an analogue or variant thereof is a monomer or a dimer

110 A method according to claim 107, wherein said OCIF is a monomer of human OCIF having a molecular weight as measured by SDS-PAGE under non-reducing conditions of about 60000 or a dimer of human OCIF having a molecular weight of about 120000 as measured by SDS-PAGE under non-reducing conditions

111 A method according to claim 107, wherein said OCIF comprises amino acids -21 to +380 of SEQ ID NO 1 of the sequence listing.

112 A method according to claim 107, wherein said OCIF comprises amino acids +1 to +380 of SEQ ID NO 1 of the sequence listing.

113 A method for the treatment or prophylaxis of a disease in a patient that is susceptible to a protein or an analogue or variant thereof comprising administering to said patient an effective amount of a complex comprising said protein or an analogue or variant thereof which is bound to at least one copolymer or a pharmacologically acceptable salt thereof according to any one of claims 1 to 74

114. A method according to claim 113, wherein the protein is a basic protein

115 A method according to claim 114, wherein the basic protein is a basic fibroblast growth factor (bFGF), an epidermal growth factor (EGF), an osteoclastogenesis inhibitory factor (OCIF), a platelet-derived growth factor (PDGF),

a brain-derived neurotrophic factor (BDNF), a nerve growth factor (NGF), a human growth hormone (HGH), a hepatocyte growth factor (HGF), or a vascular endothelial growth factor (VEGF), or an analogue or a variant thereof.

116 A method according to claim 114, wherein the basic protein is an osteoclastogenesis inhibitory factor (OCIF) or an analogue or a variant thereof.

117 A pharmaceutical composition according to claim 116, wherein said OCIF or an analogue or variant thereof is natural type or recombinant type OCIF

118 A method according to claim 116, wherein said OCIF or an analogue or variant thereof is a monomer or a dimer

119 A method according to claim 116, wherein said OCIF is a monomer of human OCIF having a molecular weight as measured by SDS-PAGE under non-reducing conditions of about 60000 or a dimer of human OCIF having a molecular weight of about 120000 as measured by SDS-PAGE under non-reducing conditions

120 A method according to claim 116, wherein said OCIF comprises amino acids -21 to +380 of SEQ ID NO 1 of the sequence listing.

121 A method according to claim 116, wherein said OCIF comprises amino acids +1 to +380 of SEQ ID NO 1 of the sequence listing.

122 A method according to any one of claims 116 to 121, wherein said disease is a bone metabolic disease.

123 Use of complex comprising a protein or an analogue or variant thereof which is bound to at least one copolymer or a pharmacologically acceptable salt thereof according to any one of claims 1 to 74 in the manufacture of a medicament for the prophylaxis or treatment of a disease susceptible to said protein or an analogue or variant thereof.

124 Use according to claim 122, wherein the protein is a basic protein.

125 Use according to claim 123, wherein the basic protein is a basic fibroblast growth factor (bFGF), an epidermal growth factor (EGF), an osteoclastogenesis inhibitory factor (OCIF), a platelet-derived growth factor (PDGF), a brain-derived neurotrophic factor (BDNF), a nerve growth factor (NGF), a human growth hormone (HGH), a hepatocyte growth factor (HGF), or a vascular endothelial growth factor (VEGF), or an analogue or a variant thereof.

126 Use according to claim 123, wherein the basic protein is an osteoclastogenesis inhibitory factor (OCIF) or an analogue or a variant thereof

127 Use according to claim 126, wherein said OCIF or an analogue or variant thereof is natural type or recombinant type OCIF

128 Use according to claim 126, wherein said OCIF or an analogue or variant thereof is a monomer or a dimer

129 Use according to claim 126, wherein said OCIF is a monomer of human OCIF having a molecular weight as measured by SDS-PAGE under non-reducing conditions of about 60000 or a dimer of human OCIF having a molecular weight of about 120000 as measured by SDS-PAGE under non-reducing conditions.

130 Use according to claim 116, wherein said OCIF comprises amino acids -21 to +380 of SEQ ID NO 1 of the sequence listing.

131 Use according to claim 116, wherein said OCIF comprises amino acids +1 to +380 of SEQ ID NO 1 of the sequence listing.

132 Use according to any one of claims 126 to 131, wherein said disease is a bone metabolic disease

Figure 1

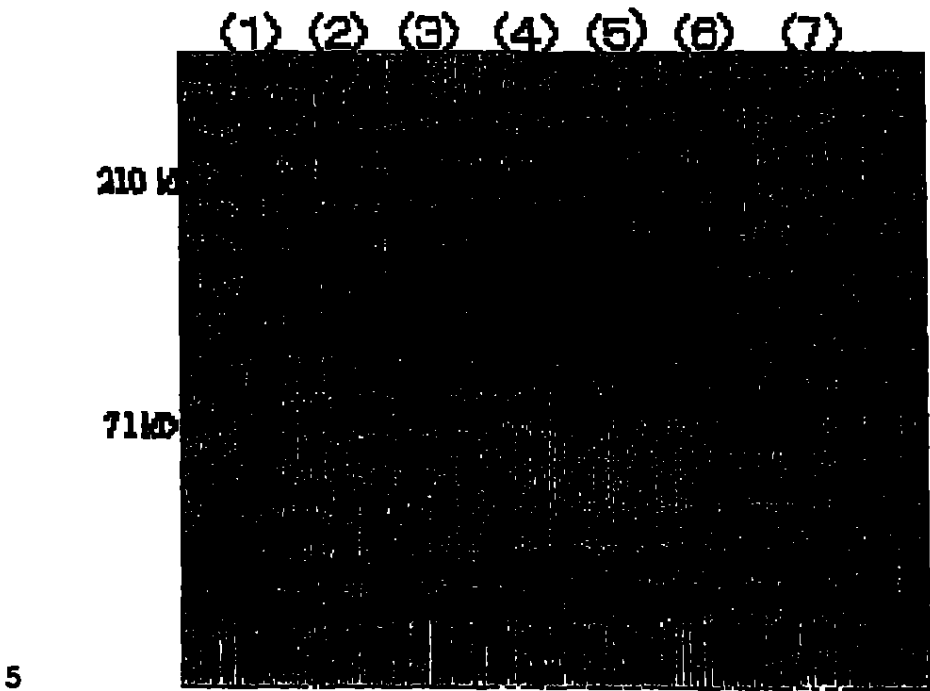
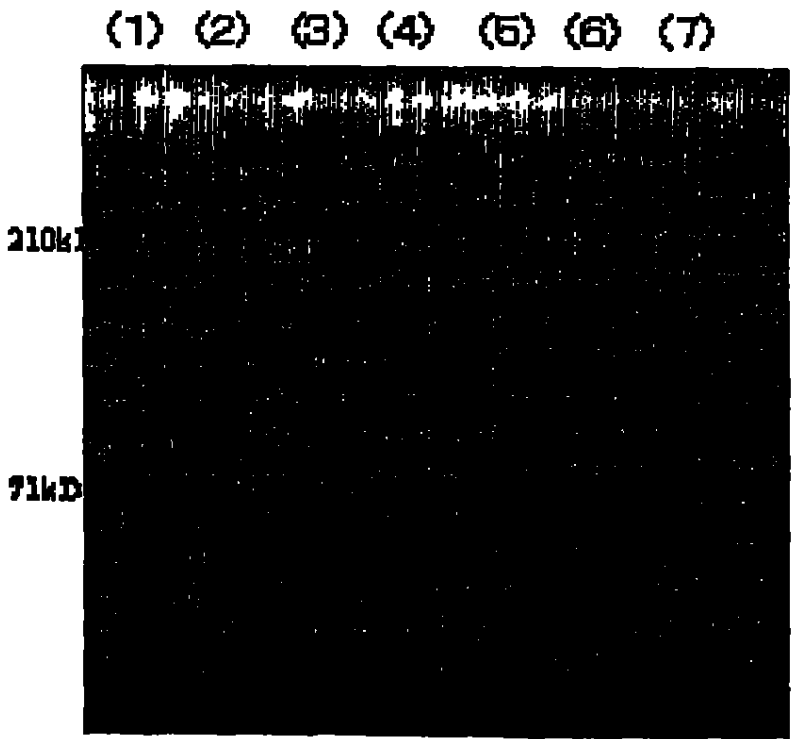


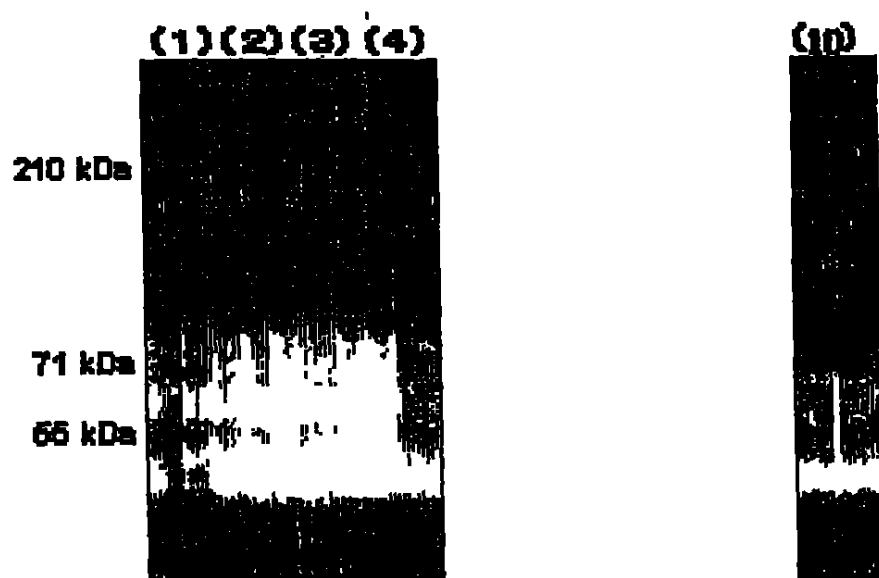
Figure 2



5

10

Figure 3



SEQUENCE LISTING

<110> Sankyo Company, Limited

5

<120> Polymeric modifiers and pharmaceutical compositions

10

<130> sankyoPP0406

<150> JP2003-80389

<151> 2003-03-24

15

<150> JP2003-355835

<151> 2003-10-16

20

<150> JP2003-426598

<151> 2003-12-24

25

<160> 1

<170> PatentIn version 3.1

5

<210> 1

<211> 401

<212> PRT

<213> Homo sapiens

10

<220>

<223> Inventor: Kasuya, Yuji

15

Inventor: Enoma, Masahi

<220>

<221> SIGNAL

<222> (-21) (-1)

20

<223>

<220>

<221> mat_peptide

25

<222> (+1) (+380)

<223>

<400> 1

Met Asn Asn Leu Leu Cys Cys Ala Leu Val Phe Leu Asp Ile Ser Ile

-20 -15 -10

5

Lys Trp Thr Thr Gln Gln Thr Phe Pro Pro Lys Tyr Leu His Tyr Asp

-5 -1 1 5 10

10

Glu Glu Thr Ser His Gln Leu Leu Cys Asp Lys Cys Pro Pro Gly Thr

15 20 25

15

Tyr Leu Lys Gln His Cys Thr Ala Lys Trp Lys Thr Val Cys Ala Pro

30 35 40

20

Cys Pro Asp His Tyr Tyr Thr Asp Ser Trp His Thr Ser Asp Glu Cys

45 50 55

25

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

5

Gly Val Val Glu Ala Gly Thr Pro Glu Arg Asn Thr Val Cys Lys Arg

110

115

120

10

Cys Pro Asp Gly Phe Phe Ser Asn Glu Thr Ser Ser Lys Ala Pro Cys

125

130

135

15

Arg Lys His Thr Asn Cys Ser Val Phe Gly Leu Leu Leu Thr Glu Lys

140

145

150

155

Gly Asn Ala Thr His Asp Asn Ile Cys Ser Gly Asn Ser Glu Ser Thr

20

160

165

170

Glu Lys Cys Gly Ile Asp Val Thr Leu Cys Glu Glu Ala Phe Phe Arg

175

180

185

25

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

5

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

10

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

15

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

20

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

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

25

Pro Ser Asp Glu 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

10

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

15

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

20

Leu
380

MODIFICACIONES Y COMPOSICIONES FARMACEUTICAS**CAMPO TECNICO**

5 La presente invención se refiere a un copolímero novedoso, una
composición farmacéutica que comprende dicho copolímero, un modificador
de proteínas que comprende dicho copolímero, un complejo de dicho
copolímero con una proteína, un método para prevenir o tratar enfermedades
usando dicho complejo, el uso de dicho complejo en la fabricación de un
10 medicamento para prevenir o tratar enfermedades, y métodos para la síntesis
de dichos copolímeros y dichos complejos

ANTECEDENTES DE LA INVENCION

15 La modificación de proteínas con agentes adicionales tales como
polímeros, se han usado comunmente con el propósito de proveer
propiedades farmacéuticas mejoradas, por ejemplo, estabilidad y retención
mejoradas en la sangre, y antigenicidad reducida [véase, por ejemplo, F M
Veronese y J M Hams, "Peptide and Protein Pegylation", Advanced Drug
20 Delivery Reviews 54(4), 2002]

Cuando se pretendía modificar proteínas con un polímero, una
técnica usada en el pasado comprendía unir la proteína y el modificador
polimérico, mediante un enlace covalente (véase, por ejemplo, el documento

WO-A-97/23614) En otros ejemplos de la modificación de una proteína con un polímero, tal como en la modificación de un fármaco con un polímero, el fármaco había sido modificado mediante un enlace no covalente. Uno de dichos ejemplos se provee en la solicitud de patente japonesa (Kokai) No Hei 5 11-302199, que describe que un copolímero de injerto, que comprende una cadena de injerto de un polímero no iónico y una cadena principal de un polímero cargado negativamente, forma un complejo de inclusión con una sustancia capaz de ser cargada positivamente bajo condiciones fisiológicas, por ejemplo, un liposoma o poli-L-lisina que posee carga positiva, para 10 mejorar la retención en la sangre. Otra alternativa se sugiere en el documento WO-A-99/02131, que describe que una proteína y un polímero soluble en agua pueden mezclarse bajo condiciones específicas en presencia de un solvente orgánico, para proveer micropartículas de liberación controlada.

Infortunadamente, pocos de estos modificadores de proteínas 15 poliméricos han sido particularmente útiles por una variedad de razones. Un ejemplo reciente de un modificador de proteínas polimérico que muestra algunas propiedades mejoradas, comprende un copolímero basado en un compuesto de ácido polimaleico que contiene un compuesto de alquil éter de polioxialquileo como unidad constituyente [véase, por ejemplo, las patentes 20 japonesas Nos 3035675 y 3271265]. Estos modificadores poliméricos muestran ciertamente unión mejorada a las proteínas objetivo. Sin embargo, existen aun problemas significativos con dichos copolímeros. Se encuentra que la porción de anhídrido maleico de los mismos se une a proteínas en

forma no específica. Esto produce los complejos obtenidos del copolímero y la proteína que muestran propiedades no uniformes, dependiendo de las condiciones. En particular, se encuentra que estos modificadores poliméricos tienden a formar fácilmente estructuras entrelazadas desorganizadas con las proteínas, formando de esta manera complejos voluminosos que causan modificación excesiva de la estructura de la proteína, y por ende reducción de la actividad deseada de la proteína. Además, se ha encontrado que los complejos de estos modificadores de proteínas poliméricos y una proteína, muestran retención insatisfactoria en la sangre después de la administración.

Por lo tanto, existe la necesidad de un modificador polimérico capaz de proveer un complejo que tenga propiedades uniformes, especialmente producción reducida de estructuras entrelazadas desorganizadas con la proteína, mejor mantenimiento de la actividad de la proteína, y retención excelente de la proteína en la sangre después de la administración de dicho complejo.

BREVE DESCRIPCION DE LA INVENCION

Por lo tanto, un objetivo de la presente invención es proveer un modificador polimérico capaz de proveer un complejo que tenga propiedades uniformes, especialmente producción reducida de estructuras entrelazadas desorganizadas con la proteína, mejor mantenimiento de la actividad de la proteína, y retención excelente de la proteína en la sangre después de la

administración de dicho complejo

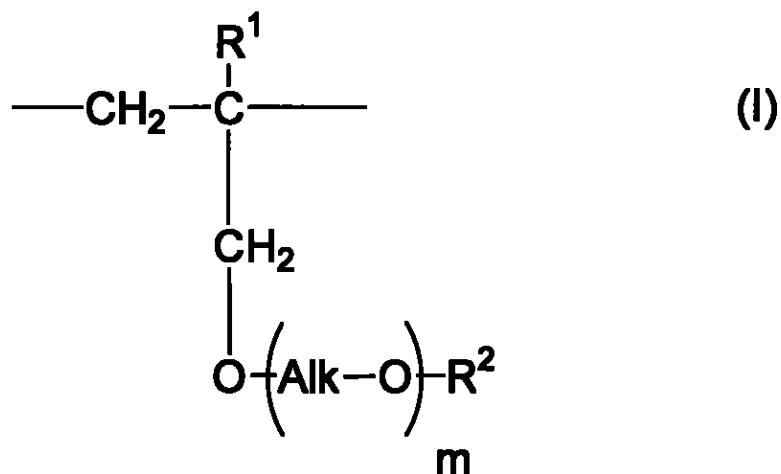
Los presentes inventores han hecho un estudio extensivo de
 varios modificadores de proteínas y, como resultado, han logrado obtener
 copolímeros novedosos que son capaces de formar complejos con proteínas
 5 que tienen propiedades uniformes, y mejorar notablemente la retención de las
 proteínas de dichos complejos en la sangre, llevando de esta manera a la
 culminación de la presente invención

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

10 De esta manera, la presente invención provee un copolímero o
 una sal farmacológicamente aceptable del mismo que contiene, como
 unidades constituyentes,

(a) una o más unidades estructurales que pueden ser iguales o
 diferentes entre sí, y que se representan mediante la fórmula (I) siguiente

15



20

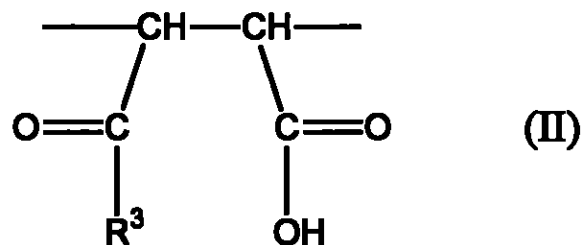
en donde

m es un entero de 3 a 100,

Alk representa un grupo alquileo que tiene de 1 a 6 átomos de carbono, y

R^1 y R^2 son iguales o diferentes, y cada uno representa un átomo de hidrógeno o un grupo alquilo que tiene de 1 a 6 átomos de carbono que puede ser sustituido opcionalmente con por lo menos un sustituyente seleccionado del grupo que consiste de grupos hidroxilo, átomos de halógeno y grupos arilo que tienen de 6 a 14 átomos de carbono que pueden ser sustituidos opcionalmente con 1 a 5 sustituyentes seleccionados de los sustituyentes A definidos más adelante, y

(b) una o más unidades estructurales que pueden ser iguales o diferentes entre sí, y que se representan mediante la fórmula (II)



en donde

R^3 representa

un grupo hidroxilo,

un grupo alcoxi que tiene de 1 a 6 átomos de carbono que puede ser sustituido opcionalmente con por lo menos un sustituyente seleccionado del grupo que consiste de grupos hidroxilo, átomos de halógeno y grupos arilo que tienen de 6 a 14 átomos de carbono que pueden ser sustituidos

opcionalmente con 1 a 5 sustituyentes seleccionados de los sustituyentes A definidos más adelante,

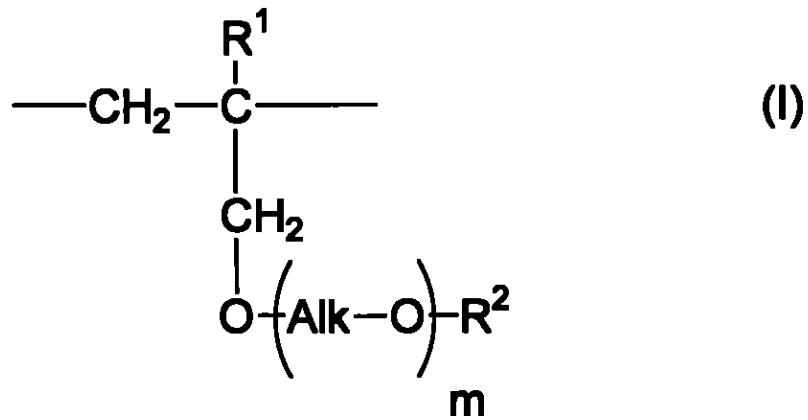
un grupo anloxi que tiene de 6 a 14 átomos de carbono que puede ser sustituido opcionalmente con 1 a 5 sustituyentes seleccionados de los sustituyentes A definidos más adelante, o

un grupo representado por la fórmula $-NR^4R^5$, en donde R^4 y R^5 son iguales o diferentes entre sí, y cada uno representa un átomo de hidrógeno o un grupo alquilo que tiene de 1 a 6 átomos de carbono que puede ser sustituido opcionalmente con por lo menos un sustituyente seleccionado del grupo que consiste de grupos hidroxí, átomos de halógeno y grupos anlo que tienen de 6 a 14 átomos de carbono que pueden ser sustituidos opcionalmente con 1 a 5 sustituyentes seleccionados de los sustituyentes A definidos más adelante,

los sustituyentes A se seleccionan de grupos alquilo que tienen de 1 a 6 átomos de carbono, grupos alcoxi que tienen de 1 a 6 átomos de carbono, átomos de halógeno, grupos hidroxí, grupos nitro y grupos carboxí

La presente invención provee además un copolímero o una sal farmacológicamente aceptable del mismo que se obtiene sometiendo una o más porciones de anhídrido carboxílico de fórmula (III) en un copolímero que contiene, como unidades constituyentes,

(a) una o más unidades estructurales que pueden ser iguales o diferentes entre sí, y que se representan mediante la fórmula (I) siguiente



5

en donde

m es un entero de 3 a 100,

10

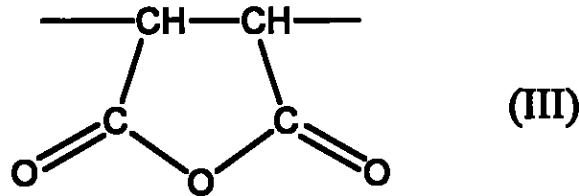
Alk representa un grupo alquileo que tiene de 1 a 6 átomos de carbono, y

15

R¹ y R² son iguales o diferentes, y cada uno representa un átomo de hidrógeno o un grupo alquilo que tiene de 1 a 6 átomos de carbono que puede ser sustituido opcionalmente con por lo menos un sustituyente seleccionado del grupo que consiste de grupos hidroxí, átomos de halógeno y grupos anilo que tienen de 6 a 14 átomos de carbono que pueden ser sustituidos opcionalmente con 1 a 5 sustituyentes seleccionados de los sustituyentes A definidos más adelante, y

20

(b) dichas una o más porciones de anhídrido carboxílico de fórmula (III)



5 a una o más reacciones seleccionadas del grupo que consiste de
(i) hidrólisis, (ii) amoniólisis, (iii) aminólisis y (iv) alcoholisis,

los sustituyentes A se seleccionan de grupos alquilo que tienen de 1 a 6 átomos de carbono, grupos alcoxi que tienen de 1 a 6 átomos de carbono, átomos de halógeno, grupos hidroxilo, grupos nitro y grupos carboxi

10 La presente invención provee también una composición farmacéutica que comprende por lo menos un copolímero o una sal farmacológicamente aceptable del mismo de la presente invención como se describió anteriormente, en particular dicha composición que comprende también por lo menos una proteína o un análogo o variante de la misma

15 La presente invención provee también un modificador capaz de modificar una proteína o un análogo o variante de la misma, dicho modificador comprendiendo un copolímero o una sal farmacológicamente aceptable del mismo de la presente invención como se describió anteriormente

20 La presente invención provee también un complejo que comprende por lo menos una proteína o un análogo o variante de la misma que se une a por lo menos un copolímero o una sal farmacológicamente aceptable del mismo de la presente invención, como se describió anteriormente

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
5 comprende por lo menos una proteína o un análogo o variante de la misma que se une a por lo menos un copolímero o una sal farmacológicamente aceptable del mismo de la presente invención, como se describió anteriormente

La presente invención provee también un método para prolongar
10 el tiempo que una proteína o un análogo o variante de la misma es retenida en la corriente sanguínea después de administración a un paciente, combinando dicha proteína o un análogo o variante de la misma con por lo menos un copolímero o una sal farmacológicamente aceptable del mismo de la presente invención, como se describió anteriormente

15 La presente invención provee también un método para el tratamiento o profilaxis de una enfermedad en un paciente que es susceptible a una proteína o un análogo o variante de la misma, el cual comprende administrar a dicho paciente una cantidad efectiva de un complejo que comprende dicha proteína o un análogo o variante de la misma que se une a
20 por lo menos un copolímero o una sal farmacológicamente aceptable del mismo de la presente invención, como se describió anteriormente

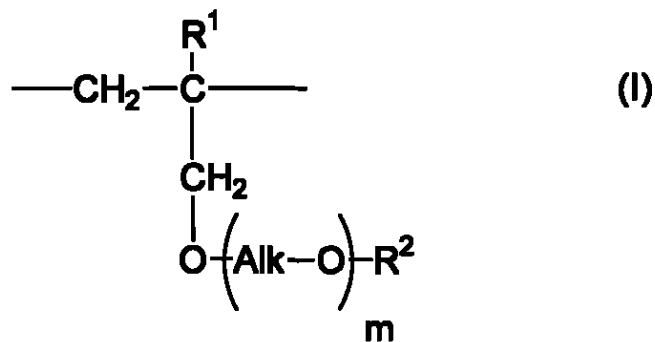
La presente invención provee también el uso de un complejo que comprende una proteína o un análogo o variante de la misma que se une a

por lo menos un copolímero o una sal farmacológicamente aceptable del mismo de la presente invención como se describió anteriormente, en la fabricación de un medicamento para la profilaxis o el tratamiento de una enfermedad susceptible a dicha proteína o un análogo o variante de la misma

5 La presente invención provee también un método para la preparación de un copolímero o una sal farmacológicamente aceptable del mismo que contiene, como unidades constituyentes,

(a) una o más unidades estructurales que pueden ser iguales o diferentes entre sí, y que se representan mediante la fórmula (I) siguiente

10



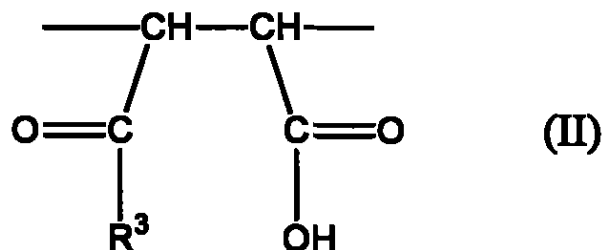
15

en donde

m, Alk, R¹ y R² son como se definieron anteriormente, y

(b) una o más unidades estructurales que pueden ser iguales o diferentes entre sí, y que se representan mediante la fórmula (II)

20



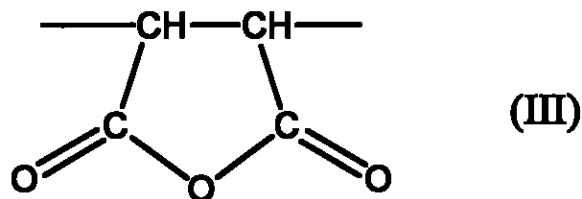
en donde

R^3 es como se definió anteriormente,

dicho método comprendiendo someter una o más porciones de anhídrido carboxílico de fórmula (III) en un copolímero que contiene, como
5 unidades constituyentes,

(c) una o más unidades estructurales que pueden ser iguales o diferentes entre sí, y que se representan mediante la fórmula (I) como se definió anteriormente, y

(d) dichas una o más porciones de anhídrido carboxílico de
10 fórmula (III)



15 a una o más reacciones seleccionadas del grupo que consiste de (i) hidrólisis, (ii) amonólisis, (iii) aminólisis y (iv) alcoholólisis

La presente invención provee también un método para la preparación de un complejo que comprende por lo menos una proteína o un análogo o variante de la misma que se une a por lo menos un copolímero o
20 una sal farmacológicamente aceptable del mismo como se definió anteriormente, dicho método comprendiendo hacer reaccionar dicho copolímero o una sal farmacológicamente aceptable del mismo, con dicha proteína o un análogo o variante de la misma bajo condiciones que favorezcan

la formación de dicho complejo

BREVE DESCRIPCION DE LAS FIGURAS

5 La figura 1 muestra los resultados de electroforesis en gel de SDS poliacrilamida sobre complejos de la presente invención de poli(PEG₅₀₀-MA) α -OCIF, bajo condiciones no reductoras llevadas a cabo en el ejemplo de prueba 6 más adelante

(1) Marcadores de peso molecular

10 (2) Complejo de poli(PEG₅₀₀-MA) α -Na (compuesto No 9)-OCIF
[OCIF modificador polimérico = 1 1 (relación en peso)]

(3) Complejo de poli(PEG₅₀₀-MA) α -Na (compuesto No 9)-OCIF
[OCIF modificador polimérico = 1 2 (relación en peso)]

(4) Complejo de poli(PEG₅₀₀-MA) α -Na (compuesto No 9)-OCIF
15 [OCIF modificador polimérico = 1 3 (relación en peso)]

(5) Complejo de poli(PEG₅₀₀-MA) α -Na (compuesto No 9)-OCIF
[OCIF modificador polimérico = 1 4 (relación en peso)]

(6) Complejo de poli(PEG₅₀₀-MA) α -Na (compuesto No 9)-OCIF
[OCIF modificador polimérico = 1 5 (relación en peso)]

20 (7) OCIF no modificado

La figura 2 muestra otros resultados de electroforesis en gel de SDS poliacrilamida sobre complejos de la presente invención de poli(PEG₅₀₀-MA) α -OCIF, bajo condiciones no reductoras llevadas a cabo en el ejemplo de

prueba 6 más adelante

(1) Marcador de peso molecular

(2) Complejo de poli(PEG₅₀₀-MA)a-Na (compuesto No 9)-OCIF

[OCIF modificador polimérico = 1 1 (relación en peso), concentración de OCIF
5 durante la incubación 3 5 mg/ml]

(3) Complejo de poli(PEG₅₀₀-MA)a-Na (compuesto No 9)-OCIF

[OCIF modificador polimérico = 1 1 (relación en peso), concentración de OCIF
durante la incubación 1 75 mg/ml]

(4) Complejo de poli(PEG₅₀₀-MA)a-Na (compuesto No 9)-OCIF

10 [OCIF modificador polimérico = 1 1 (relación en peso), concentración de OCIF
durante la incubación 0 875 mg/ml]

(5) Complejo de poli(PEG₅₀₀-MA)a-Na (compuesto No 9)-OCIF

[OCIF modificador polimérico = 1 2 (relación en peso), concentración de OCIF
durante la incubación 1 75 mg/ml]

15 (6) Complejo de poli(PEG₅₀₀-MA)a-Na (compuesto No 9)-OCIF

[OCIF modificador polimérico = 1 4 (relación en peso), concentración de OCIF
durante la incubación 0 875 mg/ml]

(7) OCIF no modificado

La figura 3 muestra los resultados de electroforesis en gel de
20 SDS poliacrilamida de complejos de poli(PEG₅₀₀-MA)-OCIF de la técnica
anterior, bajo condiciones no reductoras llevadas a cabo en el ejemplo de
prueba 6 más adelante

(1) Marcador de peso molecular

(2) Complejo de poli(PEG₅₀₀-MA) (AM-0530K)-OCIF [OCIF modificador polimérico = 1 10 (relación en peso)]

(3) Complejo de poli(PEG₅₀₀-MA) (AM-0530K)-OCIF [OCIF modificador polimérico = 1 2 5 (relación en peso)]

5 (4) Complejo de poli(PEG₅₀₀-MA) (AM-0530K)-OCIF [OCIF modificador polimérico = 1 1 (relación en peso)]

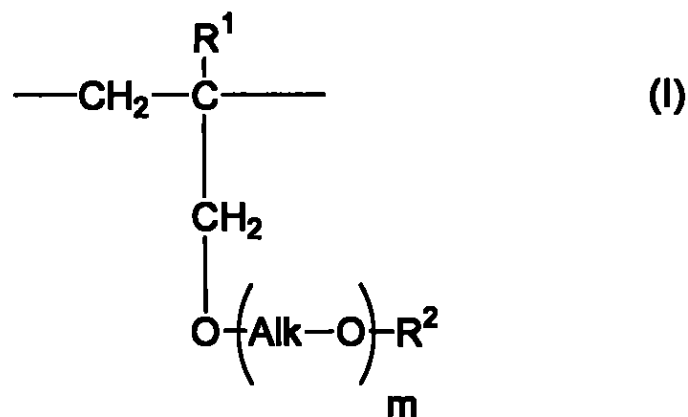
(10) OCIF no modificado

DESCRIPCION DETALLADA DE LA INVENCION

10

(1) Como se indicó anteriormente, un aspecto de la presente invención provee un copolímero o una sal farmacológicamente aceptable del mismo que contiene, como unidades constituyentes,

(a) una o más unidades estructurales que pueden ser iguales o
15 diferentes entre sí, y que se representan mediante la fórmula (I) siguiente

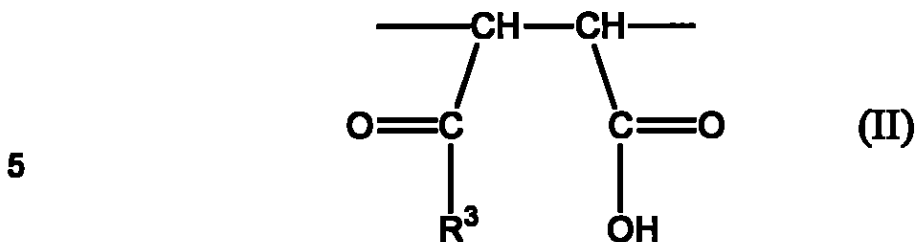


20

en donde

m, Alk, R¹ y R² son como se definieron anteriormente, y

(b) una o más unidades estructurales que pueden ser iguales o diferentes entre sí, y que se representan mediante la fórmula (II)



en donde R^3 es como se definió anteriormente. De estos copolímeros y sales farmacológicamente aceptables de los mismos, se prefieren los que incluyen

10 (2) un copolímero o una sal farmacológicamente aceptable del mismo de acuerdo con (1), en donde las unidades estructurales representadas por la fórmula (I), y las unidades estructurales representadas por la fórmula (II), están dispuestas en una secuencia alterna de cabeza a cabeza, una secuencia alterna de cabeza a cola, o una secuencia mixta alterna de cabeza a cabeza y cabeza a cola,

(3) un copolímero o una sal farmacológicamente aceptable del mismo de acuerdo con (1), en donde las unidades estructurales representadas por la fórmula (I), y las unidades estructurales representadas por la fórmula (II), están dispuestas en una secuencia aleatoria,

20 (4) un copolímero o una sal farmacológicamente aceptable del mismo de acuerdo con cualquiera de (1) a (3), en donde Alk es un grupo etileno o trimetileno,

(5) un copolímero o una sal farmacológicamente aceptable del

mismo de acuerdo con (4), en donde Alk es un grupo etileno,

(6) un copolímero o una sal farmacológicamente aceptable del mismo de acuerdo con cualquiera de (1) a (5), en donde m es un entero de 3 a 50,

5 (7) un copolímero o una sal farmacológicamente aceptable del mismo de acuerdo con (6), en donde m es un entero de 3 a 40,

(8) un copolímero o una sal farmacológicamente aceptable del mismo de acuerdo con (7), en donde m es un entero de 6 a 16 ó 28 a 38,

(9) un copolímero o una sal farmacológicamente aceptable del
10 mismo de acuerdo con (8), en donde m es un entero de 6 a 16,

(10) un copolímero o una sal farmacológicamente aceptable del mismo de acuerdo con cualquiera de (1) a (9), en donde R¹ es un átomo de hidrógeno o un grupo metilo,

(11) un copolímero o una sal farmacológicamente aceptable del
15 mismo de acuerdo con (10), en donde R¹ es un átomo de hidrógeno,

(12) un copolímero o una sal farmacológicamente aceptable del mismo de acuerdo con cualquiera de (1) a (11), en donde R² es un átomo de hidrógeno o un grupo metilo,

(13) un copolímero o una sal farmacológicamente aceptable del
20 mismo de acuerdo con (12), en donde R² es un grupo metilo,

(14) un copolímero o una sal farmacológicamente aceptable del mismo de acuerdo con cualquiera de (1) a (13), en donde R³ es un grupo hidroxilo, un grupo alcoxi que tiene de 1 a 6 átomos de carbono, o un grupo

representado por la fórmula $-NR^4R^5$, en donde R^4 y R^5 son iguales o diferentes, y cada uno representa un átomo de hidrógeno o un grupo alquilo que tiene de 1 a 6 átomos de carbono,

(15) un copolímero o una sal farmacológicamente aceptable del mismo de acuerdo con (14), en donde R^3 es un grupo hidroxilo o un grupo alcoxi que tiene de 1 a 6 átomos de carbono,

(16) un copolímero o una sal farmacológicamente aceptable del mismo de acuerdo con (15), que comprende por lo menos una unidad estructural representada por la fórmula (II), en donde R^3 es un grupo alcoxi que tiene de 1 a 6 átomos de carbono, y opcionalmente por lo menos una unidad estructural representada por la fórmula (II), en donde R^3 es un grupo hidroxilo, en donde la relación entre las unidades estructurales representadas por la fórmula (II), en donde R^3 es un grupo hidroxi, y las unidades estructurales representadas por la fórmula (II), en donde R^3 es un grupo alcoxi que tiene de 1 a 6 átomos de carbono, está en la escala de 4 a 10,

(17) un copolímero o una sal farmacológicamente aceptable del mismo de acuerdo con (15) o (16), en donde R^3 es un grupo alcoxi que tiene de 1 a 6 átomos de carbono,

(18) un copolímero o una sal farmacológicamente aceptable del mismo de acuerdo con cualquiera de (15) a (17), en donde dicho grupo alcoxi que tiene de 1 a 6 átomos de carbono, es un grupo etoxi,

(19) un copolímero o una sal farmacológicamente aceptable del mismo de acuerdo con (14), en donde R^3 es un grupo hidroxilo o un grupo

representado por la fórmula $-NR^4R^5$, en donde R^4 y R^5 son iguales o diferentes, y cada uno representa un átomo de hidrógeno o un grupo alquilo que tiene de 1 a 6 átomos de carbono,

(20) un copolímero o una sal farmacológicamente aceptable del mismo de acuerdo con (19), que comprende por lo menos una unidad estructural representada por la fórmula (II), en donde R^3 es un grupo representado por la fórmula $-NR^4R^5$, en donde R^4 y R^5 son iguales o diferentes, y cada uno representa un átomo de hidrógeno o un grupo alquilo que tiene de 1 a 6 átomos de carbono, y opcionalmente por lo menos una unidad estructural representada por la fórmula (II), en donde R^3 es un grupo hidroxilo, en donde la relación entre las unidades estructurales representadas por la fórmula (II) en donde R^3 es un grupo hidroxilo, y las unidades estructurales representadas por la fórmula (II) en donde R^3 es un grupo representado por la fórmula $-NR^4R^5$, está en la escala de 5 a 10,

(21) un copolímero o una sal farmacológicamente aceptable del mismo de acuerdo con (20), en donde la relación entre las unidades estructurales representadas por la fórmula (II), en donde R^3 es un grupo hidroxilo, y las unidades estructurales representadas por la fórmula (II), en donde R^3 es un grupo representado por la fórmula $-NR^4R^5$, está en la escala de 4 a 10,

(22) un copolímero o una sal farmacológicamente aceptable del mismo de acuerdo con cualquiera de (19) a (21), en donde R^3 es un grupo representado por la fórmula $-NR^4R^5$, en donde R^4 y R^5 son iguales o

diferentes, y cada uno representa un átomo de hidrógeno o un grupo alquilo que tiene de 1 a 6 átomos de carbono,

(23) un copolímero o una sal farmacológicamente aceptable del mismo de acuerdo con cualquiera de (19) a (22), en donde el grupo
5 representado por la fórmula $-NR^4R^5$ es un grupo amino, un grupo metilamino o un grupo dimetilamino,

(24) un copolímero o una sal farmacológicamente aceptable del mismo de acuerdo con (23), en donde el grupo representado por la fórmula $-NR^4R^5$ es un grupo amino,

10 (25) un copolímero o una sal farmacológicamente aceptable del mismo de acuerdo con (23), en donde el grupo representado por la fórmula $-NR^4R^5$ es un grupo dimetilamino,

(26) un copolímero o una sal farmacológicamente aceptable del mismo de acuerdo con (14), en donde R^3 es un grupo hidroxilo,

15 (27) un copolímero o una sal farmacológicamente aceptable del mismo de acuerdo con (14), en donde R^3 es un grupo 1-amino-2-propanol,

(28) un copolímero o una sal farmacológicamente aceptable del mismo de acuerdo con cualquiera de (1) a (27), en donde la relación entre la unidad estructural representada por la fórmula (I), y la unidad estructural
20 representada por la fórmula (II), está en la escala de 10¹ a 10⁻¹,

(29) un copolímero o una sal farmacológicamente aceptable del mismo de acuerdo con (28), en donde la relación entre la unidad estructural representada por la fórmula (I), y la unidad estructural representada por la

fórmula (II), está en la escala de 3 1 a 1 8,

(30) un copolímero o una sal farmacológicamente aceptable del mismo de acuerdo con (28), en donde la relación entre la unidad estructural representada por la fórmula (I), y la unidad estructural representada por la
5 fórmula (II), está en la escala de 2 1 a 1 2 ó 1 2 a 1 6,

(31) un copolímero o una sal farmacológicamente aceptable del mismo de acuerdo con (28), en donde la relación entre la unidad estructural representada por la fórmula (I), y la unidad estructural representada por la fórmula (II), es de 1 1, o está en la escala de 1 2 a 1 4,

10 (32) un copolímero o una sal farmacológicamente aceptable del mismo de acuerdo con cualquiera de (1) a (31), en donde el grado de polimerización promedio está en la escala de 5 a 200,

(33) un copolímero o una sal farmacológicamente aceptable del mismo de acuerdo con (32), en donde el grado de polimerización promedio
15 está en la escala de 5 a 50,

(34) un copolímero o una sal farmacológicamente aceptable del mismo de acuerdo con (33), en donde el grado de polimerización promedio está en la escala de 5 a 20,

(35) un copolímero o una sal farmacológicamente aceptable del
20 mismo de acuerdo con (32), en donde el grado de polimerización promedio está en la escala de 20 a 30,

(36) un copolímero o una sal farmacológicamente aceptable del mismo de acuerdo con (32), en donde el grado de polimerización promedio

está en la escala de 30 a 40,

(37) un copolímero o una sal farmacológicamente aceptable del mismo de acuerdo con cualquiera de (1) a (31), en donde el radio de Stokes del mismo es de 9.3 nm o menos,

5 (38) un copolímero o una sal farmacológicamente aceptable del mismo de acuerdo con (37), en donde el radio de Stokes del mismo es de 7.3 nm o menos,

(39) un copolímero o una sal farmacológicamente aceptable del mismo de acuerdo con (38), en donde el radio de Stokes del mismo es de 6.2
10 nm o menos,

(40) un copolímero o una sal farmacológicamente aceptable del mismo de acuerdo con (39), en donde el radio de Stokes del mismo es de 4.7 nm o menos,

(41) un copolímero o una sal farmacológicamente aceptable del mismo de acuerdo con (40), en donde el radio de Stokes del mismo es de 3.1
15 nm o menos,

(42) un copolímero o una sal farmacológicamente aceptable del mismo de acuerdo con (37), en donde el radio de Stokes del mismo está en la escala de 1.5 nm a 4.7 nm,

20 (43) un copolímero o una sal farmacológicamente aceptable del mismo de acuerdo con (37), en donde el radio de Stokes del mismo está en la escala de 3.1 nm a 6.2 nm, y

(44) un copolímero o una sal farmacológicamente aceptable del

mismo de acuerdo con (1), en donde

m es un entero de 3 a 100,

Alk representa un grupo alquileo que tiene de 1 a 6 átomos de carbono,

5 R^1 y R^2 son iguales o diferentes, y cada uno representa un átomo de hidrógeno o un grupo alquilo que tiene de 1 a 6 átomos de carbono, y

R^3 representa un grupo hidroxilo, un grupo alcoxi que tiene de 1 a 6 átomos de carbono que puede ser sustituido opcionalmente con un grupo hidroxilo, o un grupo representado por la fórmula $-NR^4R^5$, en donde R^4 y R^5 son
10 iguales o diferentes entre sí, y cada uno representa un átomo de hidrógeno o un grupo alquilo que tiene de 1 a 6 átomos de carbono que puede ser sustituido opcionalmente con un grupo hidroxilo,

(45) un copolímero o una sal farmacológicamente aceptable del mismo de acuerdo con (1), en donde Alk representa un grupo etileno, R^1
15 representa un átomo de hidrógeno, R^2 representa un grupo metilo, y m R^3 la relación de las unidades estructurales de fórmulas (I) y (II) (la relación de la composición) y, cuando sea relevante, la relación entre las unidades de fórmula (II), en donde R^3 representa un grupo hidroxilo, y las unidades de fórmula (II), en donde R^3 representa un grupo diferente de hidroxilo (la relación
20 de hidrólisis), se seleccionan de los siguientes

(i) m es de 6 a 16, R^3 es un grupo hidroxilo, la relación de la composición es de 1 1, y el grado de polimerización promedio es de 30 a 40,

(ii) m es de 28 a 38, R^3 es un grupo hidroxilo, la relación de la

composición es de 1 1, y el grado de polimerización promedio es de 10 a 15,

(iii) m es de 6 a 16, R^3 es un grupo amino, la relación de la composición es de 1 1, y el grado de polimerización promedio es de 30 a 40,

(iv) m es de 6 a 16, R^3 es un grupo dimetilamino, la relación de la
5 composición es de 1 1, y el grado de polimerización promedio es de 30 a 40,

(v) m es de 6 a 16, R^3 es un grupo 1-amino-2-propanol, la
relación de la composición es de 1 1, y el grado de polimerización promedio
es de 30 a 40,

(vi) m es de 6 a 16, R^3 se selecciona de grupos etoxi e hidroxil, la
10 relación de la composición es de 1 1, el grado de polimerización promedio es
de 30 a 40, y la relación de hidrólisis es de 4 6,

(vii) m es de 28 a 16, R^3 se selecciona de grupos amino e
hidroxil, la relación de la composición es de 1 1, el grado de polimerización
promedio es de 10 a 15, y la relación de hidrólisis es de 4 6,

(viii) m es de 28 a 38, R^3 es un grupo dimetilamino, la relación de
15 la composición es de 1 1, y el grado de polimerización promedio es de 10 a
15,

(ix) m es de 6 a 16, R^3 se selecciona de grupos amino e hidroxil,
la relación de la composición es de 1 1, el grado de polimerización promedio
20 es de 30 a 40, la relación de hidrólisis es de 3 1 6 9, y el copolímero es una
sal de sodio,

(x) m es de 6 a 16, R^3 se selecciona de grupos amino e hidroxil,
la relación de la composición es de 1 1, el grado de polimerización promedio

es de 30 a 40, y la relación de hidrólisis es de 1 4 8 6,

(xi) m es de 6 a 16, R^3 se selecciona de grupos dimetilamino e hidroxil, la relación de la composición es de 1 1, el grado de polimerización promedio es de 30 a 40, la relación de hidrólisis es de 2 9 7 1, y el copolímero
5 es una sal de sodio,

(xii) m es de 6 a 16, R^3 es un grupo amino, la relación de la composición es de 1 2 4, y el grado de polimerización promedio es de 20 a 30,

(xiii) m es de 6 a 16, R^3 se selecciona de grupos amino e hidroxil, la relación de la composición es de 1 2 4, el grado de polimerización promedio
10 es de 20 a 30, y la relación de hidrólisis es de 0 4 9 6,

(xiv) m es de 6 a 16, R^3 se selecciona de grupos amino e hidroxil, la relación de la composición es de 1 2 4, el grado de polimerización promedio es de 20 a 30, y la relación de hidrólisis es de 2 9 7 1,

(xv) m es de 6 a 16, R^3 se selecciona de grupos amino e hidroxil, la relación de la composición es de 1 2 4, el grado de polimerización promedio
15 es de 20 a 30, y la relación de hidrólisis es de 0 9 9 1,

(xvi) m es de 6 a 16, R^3 se selecciona de grupos amino e hidroxil, la relación de la composición es de 1 2 4, el grado de polimerización promedio es de 20 a 30, y la relación de hidrólisis es de 0 5 9 5,

(xvii) m es de 6 a 16, R^3 se selecciona de grupos amino e hidroxil, la relación de la composición es de 1 2 4, el grado de polimerización promedio es de 20 a 30, y la relación de hidrólisis es de 1 3 8 7,
20

(xviii) m es de 6 a 16, R^3 se selecciona de grupos amino e



hidroxi, la relación de la composición es de 1 2 4, el grado de polimerización promedio es de 20 a 30, y la relación de hidrólisis es de 1 9 8 1,

(xix) m es de 6 a 16, R^3 se selecciona de grupos amino e hidroxi, la relación de la composición es de 1 2 4, el grado de polimerización promedio es de 20 a 30, y la relación de hidrólisis es de 1 0 9 0,

(xx) m es de 6 a 16, R^3 se selecciona de grupos amino e hidroxi, la relación de la composición es de 1 2 4, el grado de polimerización promedio es de 20 a 30, y la relación de hidrólisis es de 0 8 9 2,

(xxi) m es de 6 a 16, R^3 se selecciona de grupos amino e hidroxi, la relación de la composición es de 1 2 4, el grado de polimerización promedio es de 20 a 30, y la relación de hidrólisis es de 4 6 5 4,

(xxii) m es de 6 a 16, R^3 se selecciona de grupos amino e hidroxi, la relación de la composición es de 1 2 4, el grado de polimerización promedio es de 20 a 30, y la relación de hidrólisis es de 1 2 8 8,

(xxiii) m es de 6 a 16, R^3 se selecciona de grupos amino e hidroxi, la relación de la composición es de 1 2 4, el grado de polimerización promedio es de 20 a 30, y la relación de hidrólisis es de 2 0 8 0,

(xxiv) m es de 6 a 16, R^3 se selecciona de grupos amino e hidroxi, la relación de la composición es de 1 2 4, el grado de polimerización promedio es de 20 a 30, y la relación de hidrólisis es de 1 1 8 9,

(xxv) m es de 6 a 16, R^3 se selecciona de grupos amino e hidroxi, la relación de la composición es de 1 2 4, el grado de polimerización promedio es de 20 a 30, y la relación de hidrólisis es de 2 4 7 6,

(xxvi) m es de 6 a 16, R^3 se selecciona de grupos amino e hidroxil, la relación de la composición es de 1 2 4, el grado de polimerización promedio es de 20 a 30, y la relación de hidrólisis es de 0 9 9 1,

5 (xxvii) m es de 6 a 16, R^3 se selecciona de grupos amino e hidroxil, la relación de la composición es de 1 2 4, el grado de polimerización promedio es de 20 a 30, y la relación de hidrólisis es de 1 5 8 5,

(xxviii) m es de 6 a 16, R^3 se selecciona de grupos amino e hidroxil, la relación de la composición es de 1 2 4, el grado de polimerización promedio es de 20 a 30, y la relación de hidrólisis es de 0 7 9 3,

10 (xxix) m es de 6 a 16, R^3 se selecciona de grupos amino e hidroxil, la relación de la composición es de 1 2 4, el grado de polimerización promedio es de 20 a 30, y la relación de hidrólisis es de 4 5 5 5,

(xxx) m es de 6 a 16, R^3 se selecciona de grupos amino e hidroxil, la relación de la composición es de 1 2 4, el grado de polimerización
15 promedio es de 20 a 30, y la relación de hidrólisis es de 1 4 8 6,

(xxxi) m es de 6 a 16, R^3 se selecciona de grupos amino e hidroxil, la relación de la composición es de 1 2 4, el grado de polimerización promedio es de 20 a 30, y la relación de hidrólisis es de 0 7 9 3,

(xxxii) m es de 6 a 16, R^3 se selecciona de grupos amino e
20 hidroxil, la relación de la composición es de 1 2 4, el grado de polimerización promedio es de 20 a 30, y la relación de hidrólisis es de 0 8 9 2,

(xxxiii) m es de 6 a 16, R^3 se selecciona de grupos amino e hidroxil, la relación de la composición es de 1 2 4, el grado de polimerización

promedio es de 20 a 30, y la relación de hidrólisis es de 1 4 8 6,

(xxxiv) m es de 6 a 16, R^3 se selecciona de grupos amino e hidroxil, la relación de la composición es de 1 2 4, el grado de polimerización promedio es de 20 a 30, y la relación de hidrólisis es de 0 7 9 3,

5 (xxxv) m es de 6 a 16, R^3 se selecciona de grupos amino e hidroxil, la relación de la composición es de 1 2 4, el grado de polimerización promedio es de 20 a 30, y la relación de hidrólisis es de 0 9 9 1,

(xxxvi) m es de 6 a 16, R^3 se selecciona de grupos amino e hidroxil, la relación de la composición es de 1 2 4, el grado de polimerización
10 promedio es de 20 a 30, y la relación de hidrólisis es de 1 9 8 1,

(xxxvii) m es de 6 a 16, R^3 se selecciona de grupos amino e hidroxil, la relación de la composición es de 1 3, el grado de polimerización promedio es de 20 a 30, y la relación de hidrólisis es de 3 1 6 9,

(xxxviii) m es de 6 a 16, R^3 se selecciona de grupos amino e
15 hidroxil, la relación de la composición es de 1 1, la relación de hidrólisis es de 1 4 8 6, y el radio de Stokes es de 9 3 nm o menos,

(xxxix) m es de 6 a 16, R^3 se selecciona de grupos amino e hidroxil, la relación de la composición es de 1 1, la relación de hidrólisis es de 1 4 8 6, y el radio de Stokes está en la escala de 3 1 a 6 2 nm,

20 (xl) m es de 6 a 16, R^3 se selecciona de grupos amino e hidroxil, la relación de la composición es de 1 1, la relación de hidrólisis es de 1 4 8 6, y el radio de Stokes está en la escala de 1 5 a 4 7 nm,

(xli) m es de 6 a 16, R^3 se selecciona de grupos amino e hidroxil,

la relación de la composición es de 1 1, la relación de hidrólisis es de 1 4 8 6,
y el radio de Stokes es de 3 1 nm o menos,

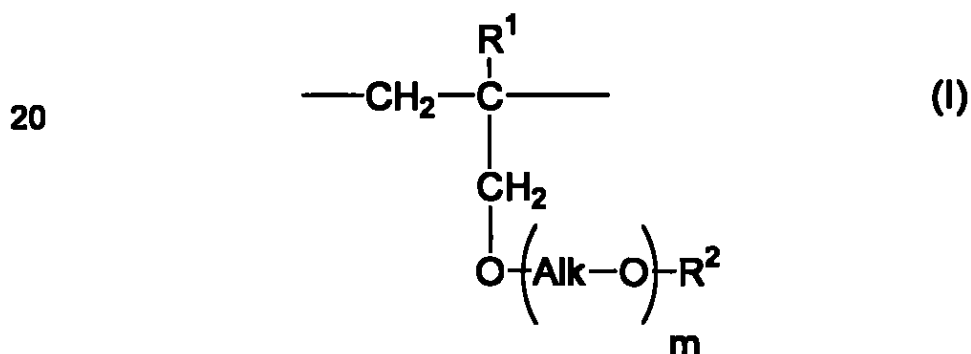
(xlii) m es de 6 a 16, R³ se selecciona de grupos amino e hidroxí,
la relación de la composición es de 1 1, la relación de hidrólisis es de 1 4 8 6,
5 y el radio de Stokes es de 7 8 nm o menos,

(xliii) m es de 6 a 16, R³ se selecciona de grupos amino e hidroxí,
la relación de la composición es de 1 1, la relación de hidrólisis es de 1 4 8 6,
y el radio de Stokes es de 6 2 nm o menos, y

(xliv) m es de 6 a 16, R³ se selecciona de grupos amino e
10 hidroxí, la relación de la composición es de 1 1, la relación de hidrólisis es de
1 4 8 6, y el radio de Stokes es de 4 7 nm o menos,

(46) Como se indicó anteriormente, otro aspecto de la presente
invención provee un copolímero o una sal farmacológicamente aceptable del
mismo que se obtiene sometiendo una o más porciones de anhídrido
15 carboxílico de fórmula (III) en un copolímero que contiene, como unidades
constituyentes,

(a) una o más unidades estructurales que pueden ser iguales o
diferentes entre sí, y que se representan mediante la fórmula (I) siguiente

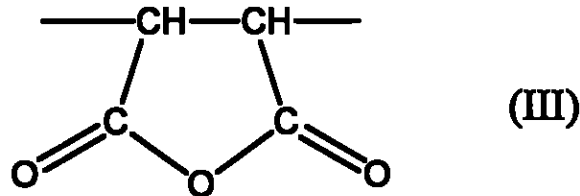


en donde

m, Alk, R¹ y R² son como se definieron anteriormente, y

(b) dicha unidad estructural comprendiendo una porción de anhídrido carboxílico de fórmula (III)

5



a una o más reacciones seleccionadas del grupo que consiste de

10 (i) hidrólisis, (ii) amonólisis, (iii) aminólisis y (iv) alcoholólisis

De estos copolímeros y sales farmacológicamente aceptables de los mismos, se prefieren los siguientes

(47) un copolímero o una sal farmacológicamente aceptable del mismo de acuerdo con (46), en donde la unidad estructural representada por la fórmula (I), y la unidad estructural representada por la fórmula (III) en el copolímero, están dispuestas en una secuencia alterna de cabeza a cabeza, una secuencia alterna de cabeza a cola, o una secuencia mixta alterna de cabeza a cabeza y cabeza a cola,

(48) un copolímero o una sal farmacológicamente aceptable del mismo de acuerdo con (46), en donde la unidad estructural representada por la fórmula (I), y la unidad estructural representada por la fórmula (III) en el copolímero, están dispuestas en secuencia aleatoria,

(49) un copolímero o una sal farmacológicamente aceptable del

mismo de acuerdo con (46) a (48), en donde Alk es un grupo etileno o trimetileno,

(50) un copolímero o una sal farmacológicamente aceptable del mismo de acuerdo con (49), en donde Alk es un grupo etileno,

5 (51) un copolímero o una sal farmacológicamente aceptable del mismo de acuerdo con cualquiera de (46) a (50), en donde m es un entero de 3 a 50,

(52) un copolímero o una sal farmacológicamente aceptable del mismo de acuerdo con (51), en donde m es un entero de 3 a 40,

10 (53) un copolímero o una sal farmacológicamente aceptable del mismo de acuerdo con (52), en donde m es un entero de 6 a 16 ó 28 a 38,

(54) un copolímero o una sal farmacológicamente aceptable del mismo de acuerdo con (53), en donde m es un entero de 6 a 16,

(55) un copolímero o una sal farmacológicamente aceptable del mismo de acuerdo con cualquiera de (46) a (54), en donde R¹ es un átomo de hidrógeno o un grupo metilo,

(56) un copolímero o una sal farmacológicamente aceptable del mismo de acuerdo con (55), en donde R¹ es un átomo de hidrógeno,

20 (57) un copolímero o una sal farmacológicamente aceptable del mismo de acuerdo con cualquiera de (46) a (56), en donde R² es un átomo de hidrógeno o un grupo metilo,

(58) un copolímero o una sal farmacológicamente aceptable del mismo de acuerdo con (57), en donde R² es un grupo metilo,

(59) un copolímero o una sal farmacológicamente aceptable del mismo de acuerdo con cualquiera de (46) a (58), en donde la relación entre la unidad estructural representada por la fórmula (I), y la unidad estructural que se obtiene sometiendo una o más unidades estructurales de fórmula (III) a una o más reacciones seleccionadas del grupo que consiste de (i) hidrólisis, (ii) amoniólisis, (iii) aminólisis y (iv) alcoholólisis, está en la escala de 10¹ a 10¹⁰,

(60) un copolímero o una sal farmacológicamente aceptable del mismo de acuerdo con (59), en donde la relación entre la unidad estructural representada por la fórmula (I), y la unidad estructural que se obtiene sometiendo una o más unidades estructurales de fórmula (III) a una o más reacciones seleccionadas del grupo que consiste de (i) hidrólisis, (ii) amoniólisis, (iii) aminólisis y (iv) alcoholólisis, está en la escala de 3¹ a 10⁸,

(61) un copolímero o una sal farmacológicamente aceptable del mismo de acuerdo con (59), en donde la relación entre la unidad estructural representada por la fórmula (I), y la unidad estructural que se obtiene sometiendo una o más unidades estructurales de fórmula (III) a una o más reacciones seleccionadas del grupo que consiste de (i) hidrólisis, (ii) amoniólisis, (iii) aminólisis y (iv) alcoholólisis, está en la escala de 2¹ a 10² ó 10² a 10⁶,

(62) un copolímero o una sal farmacológicamente aceptable del mismo de acuerdo con (59), en donde la relación entre la unidad estructural representada por la fórmula (I), y la unidad estructural que se obtiene sometiendo una o más unidades estructurales de fórmula (III) a una o más

reacciones seleccionadas del grupo que consiste de (i) hidrólisis, (ii) amonólisis, (iii) aminólisis y (iv) alcoholólisis es de 1 1, o está en la escala de 1 2 a 1 4,

(63) un copolímero o una sal farmacológicamente aceptable del mismo de acuerdo con cualquiera de (46) a (62), en donde el grado de polimerización promedio está en la escala de 5 a 200,

(64) un copolímero o una sal farmacológicamente aceptable del mismo de acuerdo con (63), en donde el grado de polimerización promedio está en la escala de 5 a 50,

10 (65) un copolímero o una sal farmacológicamente aceptable del mismo de acuerdo con (64), en donde el grado de polimerización promedio está en la escala de 5 a 20,

(66) un copolímero o una sal farmacológicamente aceptable del mismo de acuerdo con (63), en donde el grado de polimerización promedio
15 está en la escala de 20 a 30,

(67) un copolímero o una sal farmacológicamente aceptable del mismo de acuerdo con (63), en donde el grado de polimerización promedio está en la escala de 30 a 40,

(68) un copolímero o una sal farmacológicamente aceptable del mismo de acuerdo con (46), en donde

m es un entero de 3 a 100,

Alk representa un grupo alquileo que tiene de 1 a 6 átomos de carbono, y

R^1 y R^2 son iguales o diferentes, y cada uno representa un átomo de hidrógeno o un grupo alquilo que tiene de 1 a 6 átomos de carbono,

(69) un copolímero o una sal farmacológicamente aceptable del mismo de acuerdo con cualquiera de (46) a (68), que se obtiene sometiendo una porción de anhídrido carboxílico de fórmula (III) en el copolímero, a amoníólisis,

(70) un copolímero o una sal farmacológicamente aceptable del mismo de acuerdo con (69), que se obtiene llevando a cabo la amoníólisis con amoníaco acuoso,

10 (71) un copolímero o una sal farmacológicamente aceptable del mismo de acuerdo con cualquiera de (46) a (68), que se obtiene sometiendo una porción de anhídrido carboxílico de fórmula (III) en el copolímero, a aminólisis,

(72) un copolímero o una sal farmacológicamente aceptable del mismo de acuerdo con (71), que se obtiene llevando a cabo la aminólisis usando una solución de dimetilamina acuosa,

(73) un copolímero o una sal farmacológicamente aceptable del mismo de acuerdo con cualquiera de (46) a (68), que se obtiene sometiendo una porción de anhídrido carboxílico de fórmula (III) en el copolímero, a alcoholólisis,

20 (74) un copolímero o una sal farmacológicamente aceptable del mismo de acuerdo con (73), que se obtiene llevando a cabo la alcoholólisis usando etanol

(75) una composición farmacéutica que comprende un diluyente o vehículo farmacéuticamente aceptable, y por lo menos un copolímero o una sal farmacológicamente aceptable del mismo de la presente invención, de acuerdo con cualquiera de (1) a (74),

5 (76) una composición farmacéutica de acuerdo con (75), en donde dicha composición comprende además por lo menos una proteína o un análogo o variante de la misma,

 (77) una composición farmacéutica de acuerdo con (76), en donde la proteína o un análogo o variante de la misma es una proteína básica,

10 (78) una composición farmacéutica de acuerdo con (77), en donde la proteína básica es un factor básico de crecimiento de fibroblastos (bFGF), un factor de crecimiento epidérmico (EGF), un factor inhibidor de osteoclastogénesis (OCIF), un factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF), un factor neurotrófico derivado de cerebro (BDNF), un factor de
15 crecimiento nervioso (NGF), una hormona de crecimiento humano (HGH), un factor de crecimiento de hepatocitos (HGF), o un factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF), o un análogo o una variante de los mismos,

 (79) una composición farmacéutica de acuerdo con (77), en donde la proteína básica es un factor inhibidor de osteoclastogénesis (OCIF),
20 o un análogo o una variante de la misma,

 (80) una composición farmacéutica de acuerdo con (79), en donde dicho OCIF o un análogo o variante del mismo es OCIF de tipo natural o de tipo recombinante,

(81) una composición farmacéutica de acuerdo con (79), en donde dicho OCIF o un análogo o variante del mismo es un monómero o un dímero,

(82) una composición farmacéutica de acuerdo con (79), en donde dicho OCIF es un monómero de OCIF de humano que tiene un peso molecular medido mediante SDS-PAGE bajo condiciones no reductoras, de alrededor de 60,000, o un dímero de OCIF de humano que tiene un peso molecular de aproximadamente 120,000 medido mediante SDS-PAGE bajo condiciones no reductoras,

(83) una composición farmacéutica de acuerdo con (79), en donde dicho OCIF comprende los aminoácidos -21 a +380 de SEQ ID NO 1 del listado de secuencias,

(84) una composición farmacéutica de acuerdo con (79), en donde dicho OCIF comprende los aminoácidos +1 a +380 de SEQ ID NO 1 del listado de secuencias,

(85) un modificador capaz de modificar una proteína o un análogo o variante de la misma, dicho modificador comprendiendo el copolímero o una sal farmacológicamente aceptable del mismo, de acuerdo con cualquiera de (1) a (74),

(86) un modificador capaz de modificar una proteína o un análogo o variante de la misma de acuerdo con (85), en donde la proteína es una proteína básica,

(87) un modificador capaz de modificar una proteína o un

análogo o variante de la misma de acuerdo con (86), en donde la proteína básica es un factor básico de crecimiento de fibroblastos (bFGF), un factor de crecimiento epidérmico (EGF), un factor inhibidor de osteoclastogénesis (OCIF), un factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF), un factor
5 neurotrófico derivado de cerebro (BDNF), un factor de crecimiento nervioso (NGF), una hormona de crecimiento humano (HGH), un factor de crecimiento de hepatocitos (HGF), o un factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF), o un análogo o una variante de los mismos,

(88) un modificador capaz de modificar una proteína o un
10 análogo o variante de la misma de acuerdo con (86), en donde la proteína básica es un factor inhibidor de osteoclastogénesis (OCIF), o un análogo o una variante de la misma,

(89) un modificador capaz de modificar una proteína o un análogo o variante de la misma de acuerdo con (88), en donde dicho OCIF o
15 un análogo o variante del mismo es OCIF de tipo natural o de tipo recombinante,

(90) un modificador capaz de modificar una proteína o un análogo o variante de la misma de acuerdo con (88), en donde dicho OCIF o un análogo o variante del mismo es un monómero o un dímero,

20 (91) un modificador capaz de modificar una proteína o un análogo o variante de la misma de acuerdo con (88), en donde dicho OCIF es un monómero de OCIF de humano que tiene un peso molecular medido mediante SDS-PAGE bajo condiciones no reductoras, de alrededor de 60,000,

o un dímero de OCIF de humano que tiene un peso molecular de aproximadamente 120,000 medido mediante SDS-PAGE bajo condiciones no reductoras,

(92) un modificador capaz de modificar una proteína o un análogo o variante de la misma de acuerdo con (88), en donde dicho OCIF comprende los aminoácidos -21 a +380 de SEQ ID NO 1 del listado de secuencias,

(93) un modificador capaz de modificar una proteína o un análogo o variante de la misma de acuerdo con (88), en donde dicho OCIF comprende los aminoácidos +1 a +380 de SEQ ID NO 1 del listado de secuencias,

(94) un complejo que comprende por lo menos una proteína o un análogo o variante de la misma que se une a por lo menos un copolímero o una sal farmacológicamente aceptable del mismo, de acuerdo con cualquiera de (1) a (74),

(95) un complejo de acuerdo con (94), en donde la proteína es una proteína básica,

(96) un complejo de acuerdo con (95), en donde la proteína básica es un factor básico de crecimiento de fibroblastos (bFGF), un factor de crecimiento epidérmico (EGF), un factor inhibidor de osteoclastogénesis (OCIF), un factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF), un factor neurotrófico derivado de cerebro (BDNF), un factor de crecimiento nervioso (NGF), una hormona de crecimiento humano (HGH), un factor de crecimiento

de hepatocitos (HGF), o un factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF),
o un análogo o una variante de los mismos,

(97) un complejo de acuerdo con (95), en donde la proteína
básica es un factor inhibidor de osteoclastogénesis (OCIF), o un análogo o
5 una variante de la misma,

(98) un complejo de acuerdo con (97), en donde dicho OCIF o un
análogo o variante del mismo es OCIF de tipo natural o de tipo recombinante,

(99) un complejo de acuerdo con (97), en donde dicho OCIF o un
análogo o variante del mismo es un monómero o un dímero,

10 (100) un complejo de acuerdo con (97), en donde dicho OCIF es
un monómero de OCIF de humano que tiene un peso molecular medido
mediante SDS-PAGE bajo condiciones no reductoras, de alrededor de 60,000,
o un dímero de OCIF de humano que tiene un peso molecular de
aproximadamente 120,000 medido mediante SDS-PAGE bajo condiciones no
15 reductoras,

(101) un complejo de acuerdo con (97), en donde dicho OCIF
comprende los aminoácidos -21 a +380 de SEQ ID NO 1 del listado de
secuencias,

(102) un complejo de acuerdo con (97), en donde dicho OCIF
20 comprende los aminoácidos +1 a +380 de SEQ ID NO 1 del listado de
secuencias,

(103) 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 está en forma de un complejo de acuerdo con cualquiera de (94) a (102),

5 (104) un método para prolongar el tiempo que una proteína o un análogo o variante de la misma es retenida en la corriente sanguínea después de administración a un paciente, combinando dicha proteína o un análogo o variante de la misma con por lo menos un copolímero o una sal farmacológicamente aceptable del mismo, de acuerdo con cualquiera de (1) a (74),

10 (105) un método de acuerdo con (104), en donde la proteína es una proteína básica,

(106) un método de acuerdo con (105), en donde la proteína básica es un factor básico de crecimiento de fibroblastos (bFGF), un factor de crecimiento epidérmico (EGF), un factor inhibidor de osteoclastogénesis (OCIF), un factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF), un factor neurotrófico derivado de cerebro (BDNF), un factor de crecimiento nervioso (NGF), una hormona de crecimiento humano (HGH), un factor de crecimiento de hepatocitos (HGF), o un factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF), o un análogo o una variante de los mismos,

20 (107) un método de acuerdo con (105), en donde la proteína básica es un factor inhibidor de osteoclastogénesis (OCIF), o un análogo o una variante de la misma,

(108) un método de acuerdo con (107), en donde dicho OCIF o

un análogo o variante del mismo es OCIF de tipo natural o de tipo recombinante,

(109) un método de acuerdo con (107), en donde dicho OCIF o un análogo o variante del mismo es un monómero o un dímero,

5 (110) un método de acuerdo con (107), en donde dicho OCIF es un monómero de OCIF de humano que tiene un peso molecular medido mediante SDS-PAGE bajo condiciones no reductoras, de alrededor de 60,000, o un dímero de OCIF de humano que tiene un peso molecular de aproximadamente 120,000 medido mediante SDS-PAGE bajo condiciones no
10 reductoras,

(111) un método de acuerdo con (107), en donde dicho OCIF comprende los aminoácidos -21 a +380 de SEQ ID NO 1 del listado de secuencias,

(112) un método de acuerdo con (107), en donde dicho OCIF
15 comprende los aminoácidos +1 a +380 de SEQ ID NO 1 del listado de secuencias,

(113) un método para el tratamiento o profilaxis de una enfermedad en un paciente que es susceptible a una proteína o un análogo o variante de la misma, el cual comprende administrar a dicho paciente una
20 cantidad efectiva de un complejo que comprende dicha proteína o un análogo o variante de la misma que se une a por lo menos un copolímero o una sal farmacológicamente aceptable del mismo, de acuerdo con cualquiera de (1) a (74),

(114) un método de acuerdo con (113), en donde la proteína es una proteína básica,

(115) un método de acuerdo con (114), en donde la proteína básica es un factor básico de crecimiento de fibroblastos (bFGF), un factor de crecimiento epidérmico (EGF), un factor inhibidor de osteoclastogénesis (OCIF), un factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF), un factor neurotrófico derivado de cerebro (BDNF), un factor de crecimiento nervioso (NGF), una hormona de crecimiento humano (HGH), un factor de crecimiento de hepatocitos (HGF), o un factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF),
5
10 o un análogo o una variante de los mismos,

(116) un método de acuerdo con (114), en donde la proteína básica es un factor inhibidor de osteoclastogénesis (OCIF), o un análogo o una variante de la misma,

(117) una composición farmacéutica de acuerdo con (116), en
15 donde dicho OCIF o un análogo o variante del mismo es OCIF de tipo natural o de tipo recombinante,

(118) un método de acuerdo con (116), en donde dicho OCIF o un análogo o variante del mismo es un monómero o un dímero,

(119) un método de acuerdo con (116), en donde dicho OCIF es
20 un monómero de OCIF de humano que tiene un peso molecular medido mediante SDS-PAGE bajo condiciones no reductoras, de alrededor de 60,000, o un dímero de OCIF de humano que tiene un peso molecular de aproximadamente 120,000 medido mediante SDS-PAGE bajo condiciones no

reductoras,

(120) un método de acuerdo con (116), en donde dicho OCIF comprende los aminoácidos -21 a +380 de SEQ ID NO 1 del listado de secuencias,

5 (121) un método de acuerdo con (116), en donde dicho OCIF comprende los aminoácidos +1 a +380 de SEQ ID NO 1 del listado de secuencias,

(122) un método de acuerdo con cualquiera de (116) a (121), en donde dicha enfermedad es una enfermedad metabólica ósea,

10 (123) el uso del complejo que comprende una proteína o un análogo o variante de la misma, que se une a por lo menos un copolímero o una sal farmacológicamente aceptable del mismo de acuerdo con cualquiera de (1) a (74), en la fabricación de un medicamento para la profilaxis o el tratamiento de una enfermedad susceptible a dicha proteína o un análogo o
15 variante de la misma,

(124) el uso de acuerdo con (122), en donde la proteína es una proteína básica,

(125) el uso de acuerdo con (123), en donde la proteína básica es un factor básico de crecimiento de fibroblastos (bFGF), un factor de
20 crecimiento epidérmico (EGF), un factor inhibidor de osteoclastogénesis (OCIF), un factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF), un factor neurotrófico derivado de cerebro (BDNF), un factor de crecimiento nervioso (NGF), una hormona de crecimiento humano (HGH), un factor de crecimiento

de hepatocitos (HGF), o un factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF), o un análogo o una variante de los mismos,

(126) el uso de acuerdo con (123), en donde la proteína básica es un factor inhibidor de osteoclastogénesis (OCIF), o un análogo o una
5 variante de la misma,

(127) el uso de acuerdo con (126), en donde dicho OCIF o un análogo o variante del mismo es OCIF de tipo natural o de tipo recombinante,

(128) el uso de acuerdo con (126), en donde dicho OCIF o un análogo o variante del mismo es un monómero o un dímero,

10 (129) el uso de acuerdo con (126), en donde dicho OCIF es un monómero de OCIF de humano que tiene un peso molecular medido mediante SDS-PAGE bajo condiciones no reductoras, de alrededor de 60,000, o un dímero de OCIF de humano que tiene un peso molecular de aproximadamente 120,000 medido mediante SDS-PAGE bajo condiciones no
15 reductoras,

(130) el uso de acuerdo con (126), en donde dicho OCIF comprende los aminoácidos -21 a +380 de SEQ ID NO 1 del listado de secuencias,

(131) el uso de acuerdo con (126), en donde dicho OCIF
20 comprende los aminoácidos +1 a +380 de SEQ ID NO 1 del listado de secuencias, y

(132) el uso de acuerdo con cualquiera de (126) a (131), en donde dicha enfermedad es una enfermedad metabólica ósea

El "grupo alquileo que tiene de 1 a 6 átomos de carbono" en la definición del sustituyente Alk en la fórmula (I) anterior, es un grupo alquileo de cadena recta o ramificada que tiene de 1 a 6 átomos de carbono, tales como un grupo metileno, metilmetileno, etileno, propileno, trimetileno, tetrametileno, 1-metiltrimetileno, 2-metiltrimetileno, 3-metiltrimetileno, pentametileno o hexametileno. Entre estos grupos alquileo, se prefieren los grupos alquileo de cadena recta o ramificada que tienen de 1 a 4 átomos de carbono, se prefieren más los grupos etileno o trimetileno, y un grupo etileno es muy preferido.

El grupo alquilo en el "grupo alquilo que tiene de 1 a 6 átomos de carbono que puede ser sustituido opcionalmente con por lo menos un sustituyente seleccionado del grupo que consiste de grupos hidroxilo, átomos de halógeno y grupos anillo que tienen de 6 a 14 átomos de carbono que pueden ser sustituidos opcionalmente con 1 a 5 sustituyentes seleccionados de los sustituyentes A definidos más adelante", en la definición de los sustituyentes R¹, R², R⁴, R⁵ y los sustituyentes A en las fórmulas (I) y (II) anteriores, es un grupo alquilo de cadena recta o ramificada que tiene de 1 a 6 átomos de carbono, tales como un grupo metilo, etilo, n-propilo, isopropilo, n-butilo, isobutilo, s-butilo, ter-butilo, n-pentilo, isopentilo, 2-metilbutilo, neopentilo, 1-etilpropilo, n-hexilo, isohexilo, 4-metilpentilo, 3-metilpentilo, 2-metilpentilo, 1-metilpentilo, 3,3-dimetilbutilo, 2,2-dimetilbutilo, 1,1-dimetilbutilo, 1,2-dimetilbutilo, 1,3-dimetilbutilo, 2,3-dimetilbutilo o 2-etilbutilo. Entre estos grupos alquilo, se prefieren los grupos alquilo de cadena recta o ramificada

130

que tienen de 1 a 4 átomos de carbono, se prefieren más los grupos metilo y etilo, y un grupo metilo es muy prefendo

El grupo alcoxi en el "grupo alcoxi que tiene de 1 a 6 átomos de carbono que puede ser sustituido opcionalmente con por lo menos un

5 sustituyente seleccionado del grupo que consiste de grupos hidroxilo, átomos de halógeno y grupos anillo que tienen de 6 a 14 átomos de carbono que pueden ser sustituidos opcionalmente con 1 a 5 sustituyentes seleccionados de los sustituyentes A definidos más adelante", en la definición del sustituyente R^3 y los sustituyentes A en las fórmulas (I) y (II) anteriores, es un

10 sustituyente en el cual el grupo alquilo mencionado anteriormente que tiene de 1 a 6 átomos de carbono, se une a un átomo de oxígeno. Ejemplos de dicho grupo alcoxi, incluyen grupos alcoxi de cadena recta o ramificada que tienen de 1 a 6 átomos de carbono, tales como un grupo metoxi, etoxi, n-propoxi, isopropoxi, n-butoxi, isobutoxi, s-butoxi, ter-butoxi, n-pentiloxi, isopentiloxi, 2-

15 metilbutoxi, neopentiloxi, n-hexiloxi, 4-metilpentiloxi, 3-metilpentiloxi, 2-metilpentiloxi, 3,3-dimetilbutoxi, 2,2-dimetilbutoxi, 1,1-dimetilbutoxi, 1,2-dimetilbutoxi, 1,3-dimetilbutoxi y 2,3-dimetilbutoxi. Entre estos grupos alcoxi, se prefieren más los grupos alcoxi de cadena recta o ramificada que tienen de 1 a 4 átomos de carbono, y un grupo etoxi es muy prefendo

20 El "átomo de halógeno" que es uno de los "sustituyentes A" anteriores, es un sustituyente opcional en el "grupo alquilo que tiene de 1 a 6 átomos de carbono que puede ser sustituido opcionalmente con por lo menos un sustituyente seleccionado del grupo que consiste de grupos hidroxilo,

átomos de halógeno y grupos anillo que tienen de 6 a 14 átomos de carbono que pueden ser sustituidos opcionalmente con 1 a 5 sustituyentes seleccionados de los sustituyentes A definidos más adelante" en la definición de los sustituyentes R^1 , R^2 , R^4 y R^5 en las fórmulas (I) y (II) anteriores, y es un
5 sustituyente opcional en el "grupo alcoxi que tiene de 1 a 6 átomos de carbono que puede ser sustituido opcionalmente con por lo menos un sustituyente seleccionado del grupo que consiste de grupos hidroxilo, átomos de halógeno y grupos anillo que tienen de 6 a 14 átomos de carbono que pueden ser
10 sustituidos opcionalmente con 1 a 5 sustituyentes seleccionados de los sustituyentes A definidos más adelante" en la definición del sustituyente R^3 en la fórmula (II) anterior, y es un átomo de flúor, un átomo de cloro, un átomo de bromo o un átomo de yodo, y de preferencia es un átomo de fluor o un átomo de cloro

El "grupo anillo que tiene de 6 a 14 átomos de carbono" que es un
15 sustituyente opcional en el "grupo alquilo que tiene de 1 a 6 átomos de carbono que puede ser sustituido opcionalmente con por lo menos un sustituyente seleccionado del grupo que consiste de grupos hidroxilo, átomos de halógeno y grupos anillo que tienen de 6 a 14 átomos de carbono que
20 pueden ser sustituidos opcionalmente con 1 a 5 sustituyentes seleccionados de los sustituyentes A definidos más adelante" en la definición de los sustituyentes R^1 , R^2 , R^4 y R^5 y un sustituyente opcional en el "grupo alcoxi que tiene de 1 a 6 átomos de carbono que puede ser sustituido opcionalmente con por lo menos un sustituyente seleccionado del grupo que consiste de grupos

hidroxi, átomos de halógeno y grupos anilo que tienen de 6 a 14 átomos de carbono" en la definición del sustituyente R^3 en la fórmula (II) anterior, es un grupo hidrocarburo aromático que tiene de 6 a 14 átomos de carbono y puede ser, por ejemplo, un grupo fenilo, indenilo, naftilo, fenantrilo o antrilo. De preferencia, es un grupo fenilo.

El "grupo aniloxi que tiene de 6 a 14 átomos de carbono que puede ser sustituido opcionalmente con 1 a 5 sustituyentes seleccionados de los sustituyentes A" en la definición del sustituyente R^3 en la fórmula (II) anterior, es un grupo anilo como se definió anteriormente que se une a un átomo de oxígeno y puede ser, por ejemplo, un grupo fenoxi, indeniloxi, naftiloxi, fenantriloxi o antriloxi. De preferencia, es un grupo fenoxi.

El "grupo alquilo que tiene de 1 a 6 átomos de carbono que es sustituido opcionalmente con por lo menos un átomo de halógeno" en la definición de los sustituyentes R^1 , R^2 , R^4 y R^5 en las fórmulas (I) y (II) anteriores, es un grupo alquilo que tiene de 1 a 6 átomos de carbono como se describió anteriormente, que es sustituido con por lo menos un átomo de halógeno como se describió anteriormente y puede ser, por ejemplo, un grupo trifluorometilo, un grupo triclorometilo, un grupo difluorometilo, un grupo diclorometilo, un grupo dibromometilo, un grupo fluorometilo, un grupo 2,2,2-trifluoroetilo, un grupo 2,2,2-tricloroetilo, un grupo 2-bromoetilo, un grupo 2-cloroetilo, un grupo 2-fluoroetilo, un grupo 2-yodoetilo, un grupo 3-cloropropilo, un grupo 4-fluorobutilo, un grupo 6-yodohexilo, un grupo 2,2-dibromometilo, o un grupo pentafluoroetilo. De preferencia, es un grupo trifluorometilo, un grupo

trclorometilo, un grupo difluorometilo o un grupo pentafluoroetilo, y es más preferiblemente un grupo trifluorometilo

Ejemplos del "grupo alquilo que tiene de 1 a 6 átomos de carbono que es sustituido opcionalmente con por lo menos un grupo hidroxil" en la definición de los sustituyentes R^1 , R^4 y R^5 en las fórmulas (I) y (II) anteriores, incluyen un grupo hidroximetilo, un grupo 1-hidroxietilo, un grupo 1-hidroxipropilo y un grupo 2-hidroxipropilo

El "grupo alcoxi que tiene de 1 a 6 átomos de carbono que es sustituido opcionalmente con por lo menos un átomo de halógeno" en las definiciones del sustituyente R^3 en la fórmula (II) anterior, es un grupo alcoxi que tiene de 1 a 6 átomos de carbono como se describió anteriormente, que es sustituido con por lo menos un átomo de halógeno como se describió anteriormente y puede ser, por ejemplo, un grupo trifluorometoxi, un grupo trclorometoxi, un grupo difluorometoxi, un grupo diclorometoxi, un grupo dibromometoxi, un grupo fluorometoxi, un grupo 2,2,2-trifluoroetoxi, un grupo 2,2,2-trcloroetoxi, un grupo 2-bromoetoxi, un grupo 2-cloroetoxi, un grupo 2-fluoroetoxi, un grupo 2-yodoetoxi, un grupo 3-cloropropoxi, un grupo 4-fluorobutoxi, un grupo 6-yodohexiloxi, un grupo 2,2-dibromoetoxi, o un grupo pentafluoroetoxi, de preferencia, es un grupo alcoxi de C_1 - C_4 sustituido con átomos de flúor o cloro, tales como un grupo trifluorometoxi, un grupo trclorometoxi, un grupo difluorometoxi o un grupo pentafluoroetoxi. Más preferiblemente, es un grupo trifluorometoxi

Ejemplos del "grupo alcoxi que tiene de 1 a 6 átomos de carbono

que es sustituido opcionalmente con por lo menos un grupo hidroxil" en la definición del sustituyente R^3 en la fórmula (II) anterior, incluyen un grupo hidroximetoxi, un grupo 1-hidroxietoxi, un grupo 1-hidroxipropoxi y un grupo 2-hidroxipropoxi

- 5 El "grupo alquilo que tiene de 1 a 6 átomos de carbono que es sustituido opcionalmente con por lo menos un grupo anillo que tiene de 6 a 14 átomos de carbono que puede ser sustituido opcionalmente con 1 a 5 sustituyentes seleccionados de los sustituyentes A" en la definición de los sustituyentes R^1 , R^2 , R^4 y R^5 en las fórmulas (I) y (II) anteriores puede ser, por
- 10 ejemplo, un grupo bencilo, un grupo 1-naftilmetilo, un grupo 2-naftilmetilo, un grupo indenilmetilo, un grupo 1-fenetilo, un grupo 2-fenetilo, un grupo 1-naftiletilo, un grupo 2-naftiletilo, un grupo 1-fenilpropilo, un grupo 2-fenilpropilo, un grupo 3-fenilpropilo, un grupo 1-naftilpropilo, un grupo 2-naftilpropilo, un grupo 3-naftilpropilo, un grupo 1-fenilbutilo, un grupo 2-fenilbutilo, un grupo 3-
- 15 fenilbutilo, un grupo 4-fenilbutilo, un grupo 1-naftilbutilo, un grupo 2-naftilbutilo, un grupo 3-naftilbutilo, un grupo 4-naftilbutilo, un grupo 1-fenilpentilo, un grupo 2-fenilpentilo, un grupo 3-fenilpentilo, un grupo 4-fenilpentilo, un grupo 5-fenilpentilo, un grupo 1-fenilhexilo, un grupo 2-fenilhexilo, un grupo 3-fenilhexilo, un grupo 4-fenilhexilo, un grupo 5-fenilhexilo, o un grupo 6-
- 20 fenilhexilo, de preferencia, es un grupo alquilo sustituido con un grupo anillo que tiene de 6 a 10 átomos de carbono, tales como un grupo bencilo, un grupo 1-naftilmetilo, un grupo 2-naftilmetilo, un grupo 1-fenetilo, un grupo 2-fenetilo, un grupo 1-naftiletilo, un grupo 2-naftiletilo, un grupo 1-fenilpropilo, un

grupo 2-fenilpropilo, un grupo 3-fenilpropilo, o un grupo 1-naftilpropilo, y más preferiblemente, es un grupo bencilo

El "grupo alcoxi que tiene de 1 a 6 átomos de carbono que es sustituido opcionalmente con por lo menos un grupo anillo que tiene de 6 a 14 átomos de carbono que puede ser sustituido opcionalmente con 1 a 5 sustituyentes seleccionados de los sustituyentes A" en la definición del sustituyente R^3 en la fórmula (II) anterior puede ser, por ejemplo, un grupo benzoxi, un grupo 1-naftilmetoxi, un grupo 2-naftilmetoxi, un grupo indenilmetoxi, un grupo 1-fenetoxi, un grupo 2-fenetoxi, un grupo 1-naftiletoxi, un grupo 2-naftiletoxi, un grupo 1-fenilpropoxi, un grupo 2-fenilpropoxi, un grupo 3-fenilpropoxi, un grupo 1-naftilpropoxi, un grupo 2-naftilpropoxi, un grupo 3-naftilpropoxi, un grupo 1-fenilbutoxi, un grupo 2-fenilbutoxi, un grupo 3-fenilbutoxi, un grupo 4-fenilbutoxi, un grupo 1-naftilbutoxi, un grupo 2-naftilbutoxi, un grupo 3-naftilbutoxi, un grupo 4-naftilbutoxi, un grupo 1-fenilpentoxi, un grupo 2-fenilpentoxi, un grupo 3-fenilpentoxi, un grupo 4-fenilpentoxi, un grupo 5-fenilpentoxi, un grupo 1-fenilhexiloxi, un grupo 2-fenilhexiloxi, un grupo 3-fenilhexiloxi, un grupo 4-fenilhexiloxi, un grupo 5-fenilhexiloxi o un grupo 6-fenilhexiloxi, de preferencia, es un grupo alquilo sustituido con un grupo anillo que tiene de 6 a 10 átomos de carbono, tales como un grupo benzoxi, un grupo 1-naftilmetoxi, un grupo 2-naftilmetoxi, un grupo 1-fenetoxi, un grupo 2-fenetoxi, un grupo 1-naftiletoxi, un grupo 2-naftiletoxi, un grupo 1-fenilpropoxi, un grupo 2-fenilpropoxi, un grupo 3-fenilpropoxi o un grupo 1-naftilpropoxi, y más preferiblemente, es un grupo

benzoxi

Cuando R^3 es un "grupo anloxi que tiene de 6 a 14 átomos de carbono que puede ser sustituido opcionalmente con 1 a 5 sustituyentes seleccionados de los sustituyentes A", se prefiere un grupo anloxi que tiene de 6 a 10 átomos de carbono que es sustituido opcionalmente con 1 a 3 sustituyentes seleccionados del grupo de sustituyentes A, más preferiblemente, es un grupo fenoxi que es sustituido opcionalmente con 1 a 3 sustituyentes seleccionados del grupo de sustituyentes A, aún más preferiblemente, es un grupo fenoxi sustituido opcionalmente con 1 a 3 átomos de halógeno, grupos alquilo que tienen de 1 a 6 átomos de carbono, grupos hidroxí o grupos nitro, y más preferiblemente, es un grupo fenoxi o un grupo p-nitrofenoxi

Cuando el copolímero de la presente invención tiene un grupo básico, el compuesto puede ser convertido a una sal farmacológicamente aceptable del mismo, haciendo reaccionar todos estos grupos básicos, o algunos de los mismos, con un ácido. Además, los copolímeros de la presente invención tienen grupos carboxilo ácidos, y el copolímero puede ser convertido a una sal farmacológicamente aceptable del mismo, haciendo reaccionar todos estos grupos carboxilo, o algunos de los mismos, con una base

Ejemplos preferidos de las sales farmacológicamente aceptables formadas con un grupo básico presente en los copolímeros de la presente invención, incluyen sales de ácidos inorgánicos tales como sales de ácidos

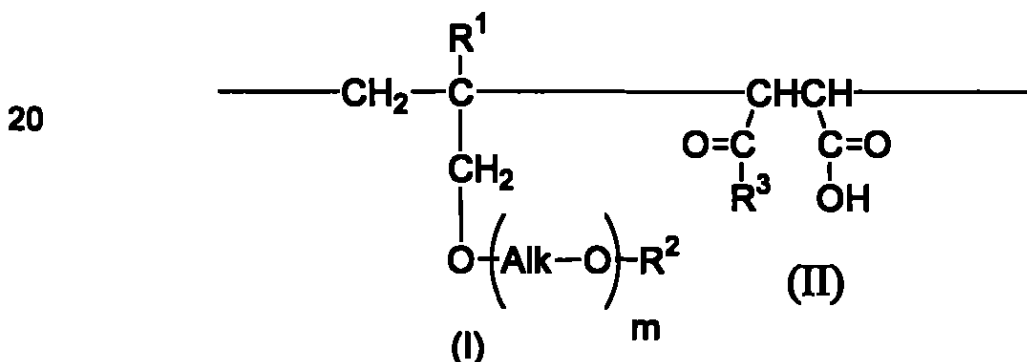
hidrohalogenados (por ejemplo, clorhidratos, bromhidratos y yodhidratos),
nitratos, percloratos, sulfatos y fosfatos, sales de ácidos orgánicos tales como
alcansulfonatos inferiores, en donde la porción de alquilo inferior de los
mismos es como se definió anteriormente (por ejemplo, metansulfonatos,
5 trifluorometansulfonatos y etansulfonatos), anilsulfonatos, en donde la porción
arilo de los mismos es como se definió anteriormente (por ejemplo,
bencensulfonato o p-toluensulfonato), acetatos, malatos, fumaratos,
succinatos, citratos, ascorbatos, tartratos, oxalatos y maleatos, y sales de
aminoácido tales como sales de glicina, sales de lisina, sales de arginina,
10 sales de ornitina, glutamatos y aspartatos. Se prefieren particularmente las
sales de ácidos hidrohalogenados.

Ejemplos preferidos de las sales farmacológicamente aceptables
formadas con un grupo carboxilo ácido presente en los copolímeros de la
presente invención, incluyen sales de metales, tales como sales de metal
15 alcalino (por ejemplo, sales de sodio, sales de potasio y sales de litio), sales
de metal alcalinotérreo (por ejemplo, sales de calcio y sales de magnesio),
sales de metales tales como sales de aluminio, sales de hierro, sales de zinc,
sales de cobre, sales de níquel y sales de cobalto, sales de amina tales como
sales de aminas inorgánicas (por ejemplo, sales de amonio) y sales de aminas
20 orgánicas (por ejemplo, sales de t-octilamina, sales de dibencilamina, sales de
morfolina, sales de glucosamina, sales de éster de fenilglicinalquilo, sales de
etilendiamina, sales de N-metilglucamina, sales de guanidina, sales de
dietilamina, sales de trietilamina, sales de dicitclohexilamina, sales de N,N'-

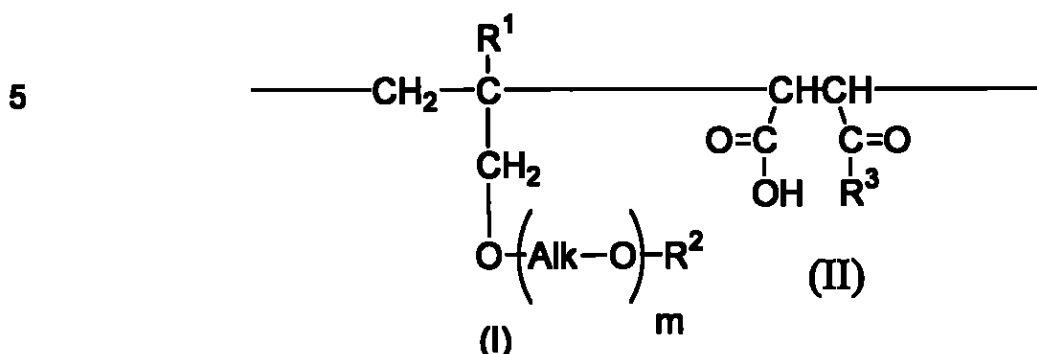
dibenciletilendiamina, sales de cloroprocaina, sales de procaina, sales de dietanolamina, sales de N-bencilfenetilamina, sales de piperazina, sales de tetrametilamonio y sales de tris(hidroximetil)aminometano, y sales de aminoácidos tales como sales de glicina, sales de lisina, sales de arginina, sales de ornitina, glutamatos y aspartatos. Se prefieren particularmente las sales de metal alcalino y las sales de metal alcalinotérreo.

En la presente invención, la "unidad estructural" se define como una unidad constituyente mínima del copolímero de la invención, y se ilustra en la definición del copolímero anterior como una unidad de fórmula (I), o una unidad de fórmula (II). La "unidad estructural" no es la estructura de un material de partida monomérico usado en una reacción de polimerización en la síntesis de un copolímero de la presente invención, más bien, es la unidad que se deriva de dicho material de partida monomérico, y está presente en dicho copolímero de la presente invención.

En la presente invención, la frase "secuencia de cabeza a cabeza" significa que las unidades estructurales representadas por las fórmulas (I) y (II), están dispuestas como se muestra mediante la fórmula siguiente:



En la presente invención, la frase "secuencia de cabeza a cola" significa que las unidades estructurales representadas por las fórmulas (I) y (II), están dispuestas como se muestra mediante la fórmula siguiente



10 En la presente invención, los copolímeros y sales farmacológicamente aceptables de los mismos pueden ser copolímeros alternos o copolímeros aleatorios. Los copolímeros alternos son aquellos en donde la relación de las unidades estructurales de fórmula (I) las unidades estructurales de fórmula (II) es de 1:1, y las unidades estructurales representadas por la fórmula (I) y las unidades estructurales representadas por la fórmula (II), están dispuestas en una secuencia alterna de cabeza a cabeza, una secuencia alterna de cabeza a cola, o una secuencia mixta alterna de cabeza a cabeza y cabeza a cola. Los copolímeros aleatorios son aquellos en donde las unidades estructurales representadas por la fórmula (I), y las unidades estructurales representadas por la fórmula (II), están dispuestas en una secuencia aleatoria.

En la presente invención, la "relación de la composición" es la relación promedio del número de unidades estructurales representadas por la

fórmula (I) el número de unidades estructurales representadas por la fórmula (II) en un copolímero de la presente invención. Cuando un copolímero es sustancialmente un copolímero alterno, la relación de la composición será de 1:1. Sin embargo, cuando un copolímero es un copolímero aleatorio, dicha relación se puede hacer variar. En los copolímeros de la presente invención, dicha relación no es particularmente limitada, y típicamente podría estar en la escala de 10:1 a 1:10, de preferencia de 3:1 a 1:8, más preferiblemente de 2:1 a 1:2 ó 1:2 a 1:6, y muy preferiblemente es de 1:1 o de 1:2 a 1:4. Debe notarse que los valores de la relación de la composición varían inevitablemente un poco, dependiendo de cambios ligeros en los materiales de partida, las condiciones de polimerización, y similares. Como resultado, las relaciones de la composición dadas son valores aproximados, se considera aun que las variaciones de hasta $\pm 30\%$ sobre los valores para las relaciones de la composición dadas anteriormente, están dentro del alcance de dichas relaciones.

La relación de la composición de los copolímeros de la presente invención, puede determinarse usando técnicas analíticas conocidas. Mediante la determinación del contenido de grupos carboxilo del copolímero (mmoles/g) por titulación conductimétrica [la determinación requiriendo la preparación del copolímero completamente hidrolizado correspondiente (es decir, R^3 es OH), hidrolizando el copolímero que se está analizando, o sintetizando el copolímero hidrolizado correspondiente por separado], y conociendo los pesos de cada una de las unidades estructurales de dicho

copolímero en la fórmula, es posible determinar la relación de la composición usando la siguiente fórmula

$$R_{II}/R_I = (C \times FW_I) / (2000 - C \times FW_{II})$$

5 en donde R_I es el número promedio de unidades estructurales (I), R_{II} es el número promedio de unidades estructurales (II), C es el contenido de grupos carboxilo del copolímero (mmoles/g), FW_I es el peso de la unidad estructural (I) en la fórmula, y FW_{II} es el peso de la unidad estructural (II) en la fórmula

10 En general, el peso molecular de un polímero se determina como un peso molecular relativo contra el de un compuesto patrón que contiene una estructura similar al de dicho polímero, y tiene un valor de peso molecular absoluto conocido. Dicho método de evaluación se usa con frecuencia en la determinación del peso molecular de los copolímeros novedosos, tales como los de la presente invención

15 El peso molecular promedio del copolímero de la presente invención, es el valor medido mediante cromatografía de filtración en gel usando un polímero que tiene un peso molecular absoluto conocido como compuesto patrón. La naturaleza del gel, las condiciones de elución y el polímero de peso molecular absoluto conocido usados en la comparación,
20 pueden ser seleccionados adecuadamente por los expertos en la técnica usando técnicas conocidas y conocimiento general, véase, por ejemplo, "Comprehensive Polymer Science", publicado por Pergamon Press (Oxford) 1989. El compuesto patrón usado con fines comparativos, es de preferencia

un polímero que tenga estructura y propiedades similares. Para los copolímeros de la presente invención, se considera que la porción de cadena lateral es un rasgo característico. Por lo tanto, el compuesto patrón usado para hacer la comparación es de preferencia un polímero que contenga una estructura similar a la de la porción de cadena lateral del copolímero de la presente invención, cuyo peso molecular promedio se medirá. Más preferiblemente, el compuesto patrón usado es un poli(etilenglicol).

En la presente invención, el "grado de polimerización promedio" es un valor promedio del grado de polimerización de las unidades estructurales en el copolímero de la presente invención, es decir, es el número promedio de unidades estructurales en dicho copolímero. Se determina con base en el peso molecular promedio del copolímero, los pesos de cada una de las unidades estructurales en la fórmula de dicho copolímero, y la relación de la composición de las unidades estructurales de dicho copolímero. El "grado de polimerización promedio" de un copolímero de la presente invención que tenga unidades estructurales I y II, puede calcularse usando la fórmula siguiente:

$$\text{Grado de polimerización promedio} = \text{Mc} / (\text{FW}_I \times R_I + \text{FW}_{II} \times R_{II})$$

en donde Mc es el peso molecular promedio del copolímero, FW_I y FW_{II} son, respectivamente, los pesos para cada una de las unidades estructurales I y II en la fórmula, y R_I y R_{II} representan las proporciones de las unidades estructurales I y II en el copolímero calculadas a partir de la relación de la composición (relación de la composición = R_I / R_{II} , $R_I + R_{II} = 1$).

En la fórmula anterior para determinar el grado de polimerización promedio de un copolímero de la presente invención, el valor de la relación de la composición de las unidades estructurales, el peso molecular promedio del copolímero, y los pesos de las unidades estructurales en la fórmula, pueden determinarse como se describió anteriormente. Para hacerlo, es necesario preparar el copolímero completamente hidrolizado, amoniolizado, aminolizado o alcoholizado correspondiente (de preferencia, el copolímero completamente hidrolizado correspondiente). En forma alternativa, si el copolímero de partida usado en la preparación del copolímero de la presente invención es de composición conocida, estos valores pueden determinarse sin la necesidad de análisis. El grado de polimerización promedio en los copolímeros de la presente invención, no es particularmente limitado. Típicamente, está en la escala de 5 a 200, de preferencia, es de 5 a 50, más preferiblemente, de 5 a 20 ó 20 a 30 ó 30 a 40.

En los copolímeros de la presente invención, las unidades estructurales de fórmula (II) pueden comprender por lo menos una unidad estructural de fórmula (II), en donde R^3 es un grupo alcoxi sustituido opcionalmente que tiene de 1 a 6 átomos de carbono, un grupo anloxi sustituido opcionalmente, o un grupo representado por la fórmula $-NR^4R^5$, y opcionalmente por lo menos una unidad estructural representada por la fórmula (II), en donde R^3 es un grupo hidroxilo. La relación entre las unidades estructurales representadas por la fórmula (II), en donde R^3 es un grupo hidroxilo y las unidades estructurales representadas por la fórmula (II), en donde

R^3 es un grupo alcoxi sustituido opcionalmente, un grupo anloxi sustituido opcionalmente, o un grupo representado por la fórmula $-NR^4R^5$, es refenda como la relación de hidrólisis. Mediante la determinación del contenido de grupos carboxilo del copolímero (mmoles/g) mediante titulación conductimétrica, y conociendo los pesos de cada una de las unidades estructurales en la fórmula de dicho copolímero y la relación de la composición (véase anteriormente), es posible determinar la relación de hidrólisis H/A usando la fórmula siguiente

$$\frac{A}{H+A} = \frac{200 \times (R_{II}/R_I) - C \times [FW_I + FW_{II} \times (R_{II}/R_I)]}{(R_{II}/R_I) \times [C \times (FW(A)_{II} - FW_{II}) + 1000]}$$

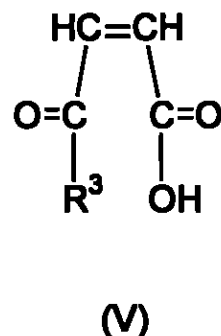
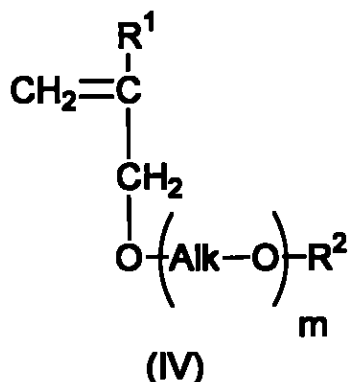
en donde H/A es la relación de hidrólisis, R_I R_{II} es la relación de la composición, C es el contenido de grupos carboxilo del copolímero (mmoles/g), FW_I es el peso de la unidad estructural (I) en la fórmula, FW_{II} es el peso de la unidad estructural (II) en la fórmula, en donde R^3 es OH, y $FW(A)_{II}$ es el peso de la unidad estructural (II) en la fórmula, en donde R^3 es un grupo alcoxi sustituido opcionalmente, un grupo anloxi sustituido opcionalmente, o un grupo representado por la fórmula $-NR^4R^5$

Escalas preferidas para la relación de hidrólisis son 5.5 a 0.10, 4.6 a 0.10, 3.7 a 0.10, 2.8 a 0.10 y 1.9 a 0.10. Debe notarse que los valores de la relación de hidrólisis varían inevitablemente un poco, dependiendo de cambios ligeros en los materiales de partida, las condiciones de reacción, y similares. Como resultado, las relaciones de hidrólisis establecidas en la presente solicitud son valores aproximados, se considera aún que las

vanaciones de hasta $\pm 30\%$ sobre los valores para las relaciones de hidrólisis establecidas en la presente solicitud, están dentro del alcance de dichas relaciones

El tamaño molecular de los copolímeros de la presente invención
5 puede medirse usando técnicas analíticas conocidas, tales como cromatografía de exclusión por tamaño, usando proteínas de tamaño molecular conocido como patrón (los ejemplos 15 y 16 más adelante proveen ejemplos del uso de dicha técnica) Mediante el uso de la técnica de cromatografía de exclusión por tamaño, el tamaño molecular de un copolímero
10 se da como su radio de Stokes En la presente invención, el tamaño molecular de los copolímeros no es particularmente limitado Típicamente, el radio de Stokes de los copolímeros de la presente invención es de 9.3 nm o menos, de preferencia de 7.3 nm o menos, más preferiblemente de 6.2 nm o menos, 4.7 nm o menos o 3.1 nm o menos, o está en la escala de 3.1 a 6.2 nm o 1.5 a 4.7
15 nm

Los copolímeros y sales farmacológicamente aceptables de los mismos de la presente invención, pueden obtenerse mediante una reacción de copolimerización adecuada conocida por los expertos en la técnica [véase, por ejemplo, "Comprehensive Polymer Science", publicado por Pergamon
20 Press (Oxford) en 1989], usando monómeros de partida representados por las fórmulas (IV) y (V) siguientes



5

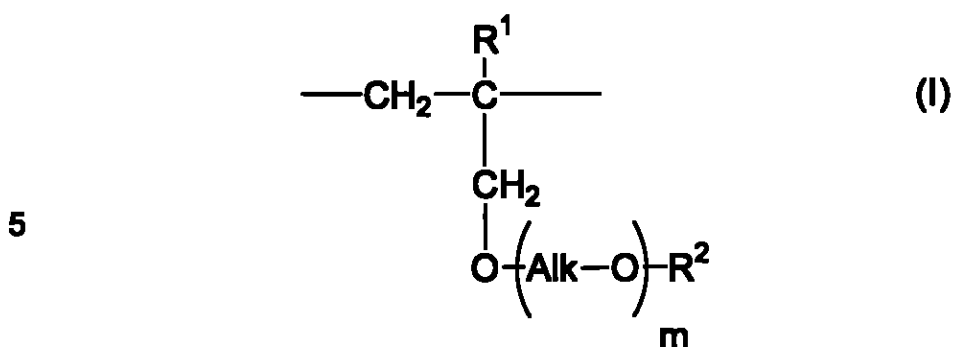
(en donde m, Alk y R¹, R² y R³, son como se definieron anteriormente) Para obtener un copolímero que tenga un grado de polimerización promedio o peso molecular deseado particular, el copolímero
10 obtenido puede fraccionarse usando cromatografía de filtración en gel

Los monómeros se conocen en la técnica, o pueden obtenerse fácilmente de acuerdo a un método bien conocido por los expertos en la materia (véase, por ejemplo, J M Harns, "Laboratory synthesis of polyethylene glycol denvatives", Rev Macromol Chem Phys C25, 326-373
15 (1985), y la patente japonesa No 2621308] Monómeros representados por la fórmula (V) pueden obtenerse fácilmente, sometiendo anhídrido maleico a una o más reacciones seleccionadas del grupo que consiste de (a) hidrólisis, (b) amoniólisis, (c) aminólisis y (d) alcoholisis

En forma alternativa, un copolímero o una sal
20 farmacológicamente aceptable del mismo puede obtenerse sometiendo una o más porciones de anhídrido carboxílico de fórmula (III) en un copolímero que contiene, como unidades constituyentes,

(a) una o más unidades estructurales que pueden ser iguales o

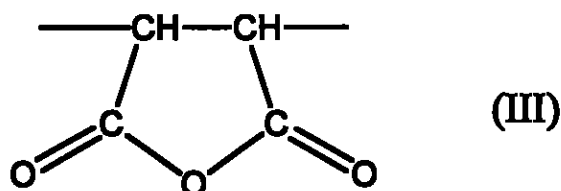
diferentes entre sí, y que se representan mediante la fórmula (I) siguiente



en donde

m, Alk, R¹ y R² son como se definieron anteriormente, y

10 (b) dicha unidad estructural comprendiendo una porción de anhídrido carboxílico de fórmula (III)



15 a una o más reacciones seleccionadas del grupo que consiste de (i) hidrólisis, (ii) amoníólisis, (iii) aminólisis y (iv) alcoholísis. Los copolímeros de partida que tienen unidades de fórmulas (I) y (III), son bien conocidos en la técnica (por ejemplo, copolímeros tales como AM-0530K y AM-1510K, pueden adquirirse de NOF Corporation), o pueden prepararse fácilmente de acuerdo a

20 un método bien conocido por los expertos en la técnica [véase, por ejemplo, Yoshimoto et al, "Polyethylene glycol derivative- modified cholesterol oxidase soluble and active in benzene", Biochem Biophys Res Comm 148, 876-882 (1987), patente japonesa No 2621308, publicación de solicitud de patente

japonesa No 2003-105040 y publicación de solicitud de patente japonesa No 2003-105003]

Para obtener un copolímero que tenga un grado de polimerización promedio deseado o peso molecular deseado, el copolímero
5 obtenido puede fraccionarse mediante cromatografía de filtración en gel

En la presente invención, pueden obtenerse copolímeros de la presente invención sometiendo una o más porciones de anhídrido carboxílico de fórmula (II), a una o más reacciones seleccionadas del grupo que consiste de (i) hidrólisis, (ii) amonólisis, (iii) aminólisis y (iv) alcoholólisis

10 En la presente invención, el término "hidrólisis" significa una reacción de apertura de anillo de una porción de anhídrido carboxílico de fórmula (III) con agua, para dar una unidad estructural de fórmula (II), en donde R^3 es un grupo hidroxilo. La naturaleza de la reacción de hidrólisis real no es particularmente limitada, en tanto sea un método usado comúnmente
15 por los expertos en la técnica

Ejemplos de un solvente adecuado que se usarán en la reacción de hidrólisis, incluyen agua, éteres tales como éter dietílico, éter diisopropílico, tetrahidrofurano, dioxano, dimetoxietano y éter dimetílico de dietilenglicol, y amidas tales como formamida, N,N-dimetilformamida, N,N-
20 dimetilacetamida, N-metil-2-pirrolidona, N-metilpirrolidinona y hexametilfosforotriamida. De estos solventes, se prefieren agua o dioxano.

El reactivo que se usará es convenientemente agua. Si se usa agua como el solvente, entonces no es necesario añadir más agua.

Adicionalmente, puede añadirse una base con el propósito de acelerar la reacción. Ejemplos de dicha base incluyen bases inorgánicas tales como carbonatos de metal alcalino (por ejemplo, carbonato de sodio, carbonato de potasio y carbonato de litio), carbonatos ácidos de metal alcalino (por ejemplo, 5 carbonato ácido de sodio, carbonato ácido de potasio y carbonato ácido de litio), hidruros de metal alcalino (por ejemplo, hidruro de litio, hidruro de sodio e hidruro de potasio), hidróxidos de metal alcalino (por ejemplo, hidróxido de sodio, hidróxido de potasio, hidróxido de bario e hidróxido de litio), fluoruros de metal alcalino (por ejemplo, fluoruro de sodio y fluoruro de potasio), y bases 10 orgánicas tales como alcóxidos de metal alcalino (por ejemplo, metóxido de sodio, etóxido de sodio, metóxido de potasio, etóxido de potasio, t-butóxido de potasio y metóxido de litio), N-metilmorfolina, tnetilamina, tnpropilamina, ttributilamina, diisopropiletilamina, dicitclohexilamina, N-metilpíndina, píndina, 4-pirrolidinopíndina, picolina, 4-(N,N-dimetilamino)píndina, 2,6-di(t-butyl)-4- 15 metilpíndina, quinolina, N,N-dimetilanilina, N,N-diétilanilina, 1,5-diazabicyclo[4 3 0]non-5-eno (DBN), 1,4-diazabicyclo[2 2 2]octano (DABCO) y 1,8-diazabicyclo[5 4 0]undec-7-eno (DBU). De estas bases, se prefieren las bases orgánicas, y se prefiere más la píndina. A este respecto, se observará que en donde la reacción de hidrólisis procede satisfactoriamente en ausencia 20 de una base, no es necesario añadir una base.

La temperatura de reacción varía, dependiendo del compuesto de partida y el reactivo, pero está usualmente en la escala de 0 a 100°C, y de preferencia en la escala de 20 a 60°C.

150

El tiempo de reacción varía, dependiendo de la temperatura de reacción, el compuesto de partida, el reactivo y el tipo de solvente usado, pero está usualmente en la escala de 10 minutos a 3 días, y de preferencia en la escala de 6 horas a 24 horas

5 Después de concluir la reacción, el compuesto deseado de la reacción de hidrólisis puede aislarse de la mezcla de reacción mediante un método convencional conocido por los expertos en la técnica. Por ejemplo, la mezcla de reacción resultante puede condensarse usando una membrana de ultrafiltración, y entonces puede deshidratarse por congelación para obtener el
10 compuesto objetivo de la reacción. En forma alternativa, el compuesto deseado puede usarse como una solución sin aislamiento de la misma, en donde se usará para modificación de proteínas

El compuesto deseado obtenido de esta manera, si es necesario, puede purificarse adicionalmente mediante una técnica convencional tal como,
15 por ejemplo, cromatografía de filtración en gel. Para obtener un compuesto que tenga un grado de polimerización promedio deseado particular o peso molecular deseado, el compuesto purificado puede fraccionarse adicionalmente usando cromatografía de filtración en gel

En la presente invención, el término "amoniólisis" significa una
20 reacción de apertura de anillo de una porción de anhídrido carboxílico de fórmula (III) con amoníaco, para dar una porción de fórmula (II), en donde R^3 es un grupo amino. La naturaleza de la reacción de amoniólisis real no es particularmente limitada, en tanto sea un método usado comúnmente por los

expertos en la técnica

Ejemplos de un solvente adecuado que se usará incluyen agua, éteres tales como éter dietílico, éter diisopropílico, tetrahydrofurano, dioxano, dimetoxietano y éter dimetílico de dietilenglicol, y amidas tales como
5 formamida, N,N-dimetilformamida, N,N-dimetilacetamida, N-metil-2-pirrolidona, N-metilpirrolidinona y hexametilfosforotriamida. De estos solventes, se prefieren agua o dioxano. Se observará que el reactivo que se usará puede usarse también como el solvente.

Ejemplos de reactivos adecuados que se usarán, incluyen
10 amoníaco gaseoso y amoníaco acuoso, y se prefiere el amoníaco.

La temperatura de reacción varía, dependiendo del compuesto de partida y el reactivo, pero está usualmente en la escala de 0 a 100°C, y de preferencia en la escala de 10 a 40°C.

El tiempo de reacción varía, dependiendo de la temperatura de
15 reacción, el compuesto de partida, el reactivo y el tipo de solvente usado, pero está usualmente en la escala de 10 minutos a 3 días, y de preferencia en la escala de 6 horas a 24 horas.

Después de concluir la reacción, el compuesto deseado de la reacción de amoniólisis puede aislarse de la mezcla de reacción mediante un
20 método convencional conocido por los expertos en la técnica. La mezcla de reacción resultante puede prepararse, por ejemplo, de la manera siguiente para aislar el compuesto objetivo: (1) diálisis a través de una membrana semipermeable mediante el uso de un ácido tal como una solución acuosa de

ácido acético para remover el exceso de amoníaco (la diálisis se lleva a cabo bajo condiciones tales que la solución de la mezcla de reacción no se vuelva ácida, añadiendo agua, según sea necesano), seguido de condensación usando una membrana de ultrafiltración, y entonces deshidratando por congelación el condensado obtenido de esta manera, o (2) adición de una solución acuosa de hidróxido de sodio y un solvente orgánico inmiscible tal como éter dietílico, agitando la mezcla de reacción (la agitación puede llevarse a cabo dos o más veces, según sea necesano), y entonces la capa acuosa separada que contiene al compuesto objetivo se deshidrata por congelación para obtener el compuesto objetivo. En forma alternativa, el compuesto deseado puede usarse como una solución sin aislamiento de la misma, en donde se usará para modificación de proteínas.

El compuesto deseado obtenido de esta manera, si es necesano, puede purificarse adicionalmente mediante una técnica convencional tal como, por ejemplo, cromatografía de filtración en gel. Para obtener un compuesto que tenga un grado de polimerización promedio deseado particular o peso molecular deseado, el compuesto purificado puede fraccionarse adicionalmente usando cromatografía de filtración en gel.

Debe observarse que el compuesto objetivo de la reacción de amoniólisis puede contener unidades estructurales de fórmula (II), en donde R^3 es un grupo hidroxilo como resultado de la hidrólisis de algunas unidades de fórmula (III) en el material de partida por agua presente en el solvente o el reactivo. Debe observarse también que puede añadirse una base al

compuesto objetivo para almacenamiento mejorado

En la presente invención, el término "aminólisis" significa una reacción de apertura de anillo de una porción de anhídrido carboxílico de fórmula (III) con una amina, para dar una porción de fórmula (II), en donde R³ es un grupo de fórmula -NR⁴R⁵, en donde R⁴ y R⁵ son como se definieron anteriormente. La naturaleza de la reacción de aminólisis real no es particularmente limitada, en tanto sea un método usado comúnmente por los expertos en la técnica.

Ejemplos de un solvente adecuado que se usará incluyen agua, éteres tales como éter dietílico, éter diisopropílico, tetrahidrofurano, dioxano, dimetoxietano y éter dimetílico de dietilenglicol, y amidas tales como formamida, N,N-dimetilformamida, N,N-dimetilacetamida, N-metil-2-pirrolidona, N-metilpirrolidinona y hexametilfosforotriamida. De estos solventes, se prefieren agua o dioxano. Se observará que el reactivo que se usará puede usarse también como el solvente.

El reactivo que se usará depende obviamente de la naturaleza del grupo objetivo de fórmula -NR⁴R⁵. Las aminas usadas típicamente incluyen metilamina, dimetilamina, etilamina, dietilamina, 2-hidroxi-etilamina, di-2-hidroxi-etilamina, n-propilamina, di-n-propilamina, isopropilamina, diisopropilamina, 1-amino-2-propanol y 2-hidroxiisopropilamina, y soluciones acuosas de las mismas. De estos reactivos, reactivos preferidos incluyen una solución acuosa de dimetilamina y 1-amino-2-propanol, se prefiere más una solución acuosa de dimetilamina.

La temperatura de reacción varía, dependiendo del compuesto de partida y el reactivo, pero está usualmente en la escala de 0 a 100°C, y de preferencia en la escala de 10 a 40°C

El tiempo de reacción varía, dependiendo de la temperatura de reacción, el compuesto de partida, el reactivo y el tipo de solvente usado, pero está usualmente en la escala de 10 minutos a 3 días, y de preferencia en la escala de 6 horas a 36 horas

Después de concluir la reacción, el compuesto deseado de la reacción de aminólisis puede aislarse de la mezcla de reacción mediante un método convencional conocido por los expertos en la técnica. La mezcla de reacción resultante puede prepararse, por ejemplo, de la manera siguiente para aislar el compuesto objetivo: (1) diálisis a través de una membrana semipermeable mediante el uso de un ácido tal como una solución acuosa de ácido acético para remover el exceso de amoníaco (la diálisis se lleva a cabo bajo condiciones tales que la solución de la mezcla de reacción no se vuelva ácida, añadiendo agua, según sea necesario), seguido de condensación usando una membrana de ultrafiltración, y entonces deshidratando por congelación el condensado obtenido de esta manera, o (2) adición de una solución acuosa de hidróxido de sodio y un solvente orgánico inmiscible tal como éter dietílico, agitando la mezcla de reacción (la agitación puede llevarse a cabo dos o más veces, según sea necesario), y entonces la capa acuosa separada que contiene al compuesto objetivo se deshidrata por congelación para obtener el compuesto objetivo. En forma alternativa, el compuesto

deseado puede usarse como una solución sin aislamiento de la misma, en donde se usará para modificación de proteínas

El compuesto deseado obtenido de esta manera, si es necesano, puede purificarse adicionalmente mediante una técnica convencional tal como, por ejemplo, cromatografía de filtración en gel. Para obtener un compuesto que tenga un grado de polimerización promedio deseado particular o peso molecular deseado, el compuesto purificado puede fraccionarse adicionalmente usando cromatografía de filtración en gel.

Debe observarse que el compuesto objetivo de la reacción de aminólisis puede contener unidades estructurales de fórmula (II), en donde R^3 es un grupo hidroxilo como resultado de la hidrólisis de algunas unidades de fórmula (III) en el material de partida por agua presente en el solvente o el reactivo. Debe observarse también que puede añadirse una base al compuesto objetivo para almacenamiento mejorado.

En la presente invención, el término "alcoholólisis" significa una reacción de apertura de anillo de una porción de anhídrido carboxílico de fórmula (III) con un alcohol o un alcohol arílico, para dar una porción de fórmula (II), en donde R^3 es un grupo alcoxi o aniloxi como se definió anteriormente. La naturaleza de la reacción de alcoholólisis real no es particularmente limitada, en tanto sea un método usado comúnmente por los expertos en la técnica.

Ejemplos del solvente que se usará la reacción de alcoholólisis incluyen agua, y amidas tales como formamida, N,N-dimetilformamida, N,N-

dimetilacetamida, N-metil-2-pirrolidona, N-metilpirrolidinona y hexametilfosforotnamida. De estos solventes, se prefieren el agua. Se observará que el reactivo que se usará puede usarse también como el solvente.

- 5 El reactivo que se usará depende obviamente de la naturaleza del grupo alcoxi o anloxi objetivo. Ejemplos típicos del alcohol usado para obtener el grupo alcoxi deseado, incluyen metanol, etanol, etilenglicol, n-propanol, propilenglicol, 2-hidroxi-n-propanol e iso-propanol, y soluciones acuosas de los mismos, mientras que ejemplos típicos del alcohol usado para
- 10 obtener el grupo anloxi deseado, incluyen fenol y p-nitrofenol. De estos reactivos, se prefiere el etanol.

La temperatura de reacción varía, dependiendo del compuesto de partida y el reactivo, pero está usualmente en la escala de 0 a 100°C, y de preferencia en la escala de 10 a 40°C.

- 15 El tiempo de reacción varía, dependiendo de la temperatura de reacción, el compuesto de partida, el reactivo y el tipo de solvente usado, pero está usualmente en la escala de 10 minutos a 3 días, y de preferencia en la escala de 6 horas a 36 horas.

- Después de concluir la reacción, el compuesto deseado de la
- 20 reacción de alcoholisis puede aislarse de la mezcla de reacción mediante un método convencional conocido por los expertos en la técnica. Por ejemplo, la mezcla de reacción puede condensarse usando una membrana de ultrafiltración, puede añadirse agua, y entonces la mezcla puede condensarse

adicionalmente dos o más veces adicionales usando una membrana de ultrafiltración para remover el exceso de alcohol, y entonces el condensado obtenido se deshidrata por congelación para obtener el compuesto deseado. En forma alternativa, el compuesto deseado puede usarse como una solución sin aislamiento de la misma, en donde se usará para modificación de proteínas.

El compuesto deseado obtenido de esta manera, si es necesario, puede purificarse adicionalmente mediante una técnica convencional tal como, por ejemplo, cromatografía de filtración en gel. Para obtener un compuesto que tenga un grado de polimerización promedio deseado particular o peso molecular deseado, el compuesto purificado puede fraccionarse adicionalmente usando cromatografía de filtración en gel.

Debe observarse que el compuesto objetivo de la reacción de alcoholisis puede contener unidades estructurales de fórmula (II), en donde R^3 es un grupo hidroxilo como resultado de la hidrólisis de algunas unidades de fórmula (III) en el material de partida por agua presente en el solvente o el reactivo. Debe observarse también que puede añadirse una base al compuesto objetivo para almacenamiento mejorado.

Cuando el copolímero deseado de la presente invención es una sal farmacológicamente aceptable, el método para preparar dicha sal no es particularmente limitado, en tanto sea un método usado comúnmente en el campo. Por ejemplo, puede obtenerse una sal farmacológicamente aceptable disolviendo el copolímero de la invención en un solvente orgánico, añadiendo

una base a la solución obtenida de esta manera, y recogiendo entonces la sal resultante precipitada

Puede usarse una variedad de tácticas para controlar el peso molecular promedio, el grado de la disposición alterna y la relación de la
5 composición de los copolímeros de la presente invención

Es bien sabido que los monómeros de anhídrido maleico tienden a polimerizarse alternativamente con comonómeros, incluyendo diéter alilmetílico de polioxietileno [véase, por ejemplo, Comprehensive Polymer Science Vol 4, Chain polymerization parte II, editado por G C Eastmond et
10 al , pp 377-422, Pergamon Press (1989), y T Yoshimoto et al , Biochemical Biophysical Research Communication Vol 148, 876-882 (1987)] El peso molecular promedio y la disposición de los polímeros pueden ser controlados por los expertos en la técnica (véase, por ejemplo, T Ohtsu y M Kinoshita, Koubunshi Gousei no Jikkenhou pp 125-154, Kagaku-Dojin 1972) Además,
15 aunque el anhídrido maleico tiende a polimerizarse en forma alternativa con comonómeros, la posibilidad de que más de 50% en moles de la relación de la composición comprenda unidades de anhídrido maleico en el copolímero, es bien conocida por los expertos en la técnica (véase las patentes japonesas No 2621308, No 2701295, No 2803265, No 3271265, No 3035675 y No
20 3106265, y las publicaciones de solicitud de patente japonesa No 2003-105003 y No 2003-105040)

En general, para obtener polímeros con un peso molecular mayor y un mayor grado de disposición alterna, la polimerización debe

llevarse a cabo bajo condiciones moderadas, tales como menor temperatura y menor concentración de iniciador. Una mayor concentración de monómeros y una menor concentración de solvente que reducen la concentración relativa del iniciador, producen también mayor peso molecular y mayor grado de

5 disposición alterna

En forma alternativa, para obtener polímeros con un menor peso molecular y un menor grado de disposición alterna, son favorables mayor temperatura, mayor concentración de iniciador, menor concentración de monómeros y mayor concentración de solvente. Asimismo, bajo dichas

10 condiciones de polimerización relativamente severas y/o siendo anhídrido maleico más de 50% en moles de los monómeros totales de la mezcla de monómeros, la relación de la composición de las unidades de anhídrido maleico en el copolímero resultante, puede ser mayor de 50% en moles

Algunos ejemplos de condiciones de polimerización para diéter

15 alilmetílico de polioxietileno y anhídrido maleico, se describen en T. Yoshimoto et al., Biochemical Biophysical Research Communication Vol. 148, 876-882 (1987). De acuerdo con esta referencia, se mezclaron diéter alilmetílico de polioxietileno, anhídrido maleico, tolueno y peróxido de benzilo (iniciador), y la polimerización se llevó a cabo mediante reflujo a 80°C durante 7 horas. El

20 polímero resultante tuvo un peso molecular de 13 kD, y poseyó 8 cadenas de PEG y 8 unidades de anhídrido maleico. Se sugirió una disposición alterna del copolímero, a partir del hecho de que tiene una relación de la composición de 1:1, y que los monómeros de anhídrido maleico tienden a copolimerizarse

alternativamente con los comonómeros. Si se requiere un copolímero que tenga un peso molecular menor y menor grado de disposición alterna, entonces debe aplicarse una mayor concentración de iniciador, menor concentración de monómeros y/o mayor concentración de solvente. Por ejemplo, cuando se usa tolueno como el solvente en la polimerización, y la polimerización se lleva a cabo a 1 atmósfera, la polimerización puede llevarse a cabo hasta su punto de ebullición de 110°C. Asimismo, se prefiere una mayor temperatura con un diferente solvente cuya temperatura de ebullición sea mayor que la del tolueno. En dichos casos, será necesario seleccionar adecuadamente el tipo de iniciador, debido a que cada iniciador tiene una constante de velocidad de descomposición específica diferente, y algunos iniciadores se descompondrían a estas mayores temperaturas. Numerosos iniciadores con diferentes velocidades de descomposición se conocen ya en la técnica [véase, por ejemplo, Polymer Handbook, tercera edición, pp II/1-II/65, editado por Brandrup y E. Immergut, John Wiley & Sons (1989)]

Solventes, iniciadores y condiciones de reacción alternativos que se usan para hacer variar la relación de la composición, el peso molecular y el grado de disposición alterna en las reacciones de copolimerización de diéter alilmetílico de polioxietileno y anhídrido maleico, se describen también en otros documentos de la técnica anterior, tales como la publicación de la solicitud de patente japonesa No 2003-105003. El xileno, por ejemplo, tiene un mayor punto de ebullición a 1 atmósfera (140°C) que el tolueno. Se sabe también que las reacciones de copolimerización pueden llevarse a cabo sin

solvente alguno en algunos casos que remueven la limitación del punto de ebullición del solvente sobre la temperatura de polimerización. Se describen también varios iniciadores alternativos tales como peróxido de benzoilo, peróxido de di-ter-butilo y peroxisobutirato de ter-butilo, y también iniciadores azo tales como azobisisobutironitrilo. También es posible disminuir el peso molecular promedio del copolímero mediante el uso de reactivos de transferencia de cadena.

Si se requiere una relación de la composición de unidades de anhídrido maleico el total de unidades monoméricas en el copolímero mayor de 50%, debe aplicarse un porcentaje incrementado de monómeros de anhídrido maleico en la mezcla de monómeros con o sin dichas condiciones de polimerización relativamente severas.

Cuando se esté preparando un ingrediente farmacéuticamente activo usando un copolímero de la presente invención o una sal farmacológicamente aceptable del mismo y una proteína o un análogo o variante de la misma, la relación del copolímero la proteína o un análogo o variante de la misma no es limitada específicamente, en tanto el complejo resultante tenga la actividad farmacéutica deseada. Típicamente, la relación en peso del copolímero de la presente invención o una sal farmacológicamente aceptable del mismo la proteína o un análogo o variante de la misma, es de 0.01 a 100:1, de preferencia, es de 0.1 a 50:1, aún más preferiblemente es de 1 a 10:1, y muy preferiblemente es de 1 a 1.5:1.

En uso práctico, un ingrediente farmacéuticamente activo que

comprende el copolímero de la presente invención o una sal farmacológicamente aceptable del mismo, y una proteína o un análogo o variante de la misma, se prepara típicamente en forma de una solución de proteína que contenga al copolímero, o uno deshidratado por congelación que

5 contenga al copolímero de la presente invención o una sal farmacológicamente aceptable del mismo y la proteína o un análogo o variante de la misma. En el último caso, la forma del ingrediente activo deshidratada por congelación se disuelve poco antes de su uso. En forma alternativa, el ingrediente farmacéuticamente activo puede prepararse en

10 forma de un equipo. En este caso, el copolímero de la presente invención o una sal farmacológicamente aceptable del mismo y una proteína o un análogo o variante de la misma, se almacenan en contenedores diferentes, y se mezclan entonces para preparar el ingrediente farmacéuticamente activo deseado poco antes del uso. De estas formas diferentes, se prefiere más la

15 forma deshidratada por congelación.

Cuando el copolímero de la presente invención o una sal farmacológicamente aceptable del mismo se usa como un modificador de proteínas, la relación del copolímero o sal farmacológicamente aceptable del mismo con respecto a la proteína o un análogo o variante de la misma, no se

20 limita particularmente a algún valor específico, en tanto se logre la modificación deseada de la proteína. Típicamente, la relación en peso del copolímero de la presente invención o una sal farmacológicamente aceptable del mismo a la proteína o un análogo o variante de la misma, es de 0.01 a

100 1, de preferencia, es de 0 1 a 50 1, aún más preferiblemente es de 1 a 10 1, y muy preferiblemente es de 1 a 1 5 1

Cuando el copolímero de la presente invención se usa como un modificador de proteínas, el método para modificar la proteína no es particularmente limitado, en tanto sea un método usado comúnmente para
5 modificar una proteína. Por ejemplo, una proteína o un análogo o variante de la misma, puede modificarse de la manera siguiente

El solvente que se usará en el procedimiento de modificación, es una solución acuosa que contiene un electrólito, el cual se usa comúnmente
10 para disolver una proteína, y el pH del mismo no se limita a algún valor específico, en tanto esté a una escala en donde el modificador de proteínas pueda ser cargado negativamente como resultado de la disociación de por lo menos algunos de los grupos carboxilo en el modificador de proteínas de la presente invención, y la proteína o un análogo o variante de la misma pueda
15 ser cargada positivamente. Por ejemplo, el pH puede ajustarse a un valor en la escala de 3, hasta el punto isoelectrico de la proteína o un análogo o variante de la misma, y de preferencia se ajusta a un valor en la escala de 4 a 8. A este respecto, debe observarse que el punto isoelectrico de la proteína o un análogo o variante de la misma puede determinarse mediante
20 electroforesis

El modificador de proteínas se disuelve en el solvente descrito anteriormente, y entonces la solución obtenida de esta manera se añade a una solución acuosa de dicha proteína o un análogo o variante de la misma

La solución obtenida puede agitarse para facilitar la reacción, si es necesario. El pH de la mezcla resultante puede ajustarse, si se desea, mediante la adición de un ácido y/o una base. La relación del modificador de proteína de la presente invención que se usará con respecto a dicha proteína o un análogo o

5 variante de la misma, no se limita a algún valor específico, en tanto dé la modificación deseada a la proteína. Típicamente, la relación está en la escala de 0.01 a 100 por ciento en peso, de preferencia en la escala de 0.1 a 50, más preferiblemente en la escala de 1 a 10, y muy preferiblemente es de 1 a 1.5.

La temperatura de reacción para el procedimiento de
10 modificación varía, dependiendo del compuesto usado y el reactivo, pero está usualmente en la escala de 0 a 100°C, de preferencia en la escala de 4 a 40°C, y más preferiblemente en la escala de 30 a 40°C.

El tiempo de reacción varía, dependiendo de la temperatura de reacción, el compuesto usado, el reactivo y el tipo de solvente usado, pero
15 está usualmente en la escala de 5 minutos a 14 días, de preferencia en la escala de 1 hora a 12 días, y más preferiblemente en la escala de 5 días a 10 días.

A veces, durante el procedimiento de modificación de la proteína, las condiciones usadas son tales, que algunas de las unidades estructurales
20 de fórmula (I) en el copolímero se convierten en unidades de fórmula (II) que tienen una identidad diferente. Por ejemplo, cuando R³ en las unidades estructurales de fórmula (II) es un grupo diferente de un grupo hidroxilo, las condiciones usadas para el procedimiento de modificación son tales, que

algunos de dichos grupos R^3 son hidrolizados para dar unidades estructurales de fórmula (II), en donde R^3 es un grupo hidroxil

Como se indicó anteriormente, los complejos de la presente invención comprenden por lo menos una proteína o un análogo o variante de la misma que se une a por lo menos un copolímero de la presente invención o una sal farmacológicamente aceptable del mismo. En dicho complejo, la proteína o un análogo o variante de la misma, y el copolímero o una sal farmacológicamente aceptable del mismo, se unen entre sí mediante un enlace químico tal como un enlace covalente (por ejemplo, formación de bases de Schiff, formación de enlaces de amida y formación de enlaces de éster), 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.

De preferencia, los complejos de la presente invención no se detectan en forma disociada a algún grado significativo cuando se someten a cromatografía de exclusión por tamaño o SDS-PAGE bajo condiciones no reductoras. Más preferiblemente, los complejos de la presente invención no se detectan en forma disociada a algún grado significativo, cuando se someten a cromatografía de exclusión por tamaño y SDS-PAGE bajo condiciones no reductoras. Aún más preferiblemente, además, el índice de falla para detectar la proteína del complejo mediante ELISA de los complejos de la presente invención como resultado de modificación de la estructura de la proteína por los copolímeros y sales farmacológicamente aceptables de los mismos, es

muy bajo (de preferencia, el índice de falla es de 20% o menos, más preferiblemente de 15% o menos, y muy preferiblemente de 10% o menos)

En la presente invención, un análogo de proteína se define como una proteína codificada por ADNc clonado de una colección de ADNc
5 derivada de células animales, fluidos corporales o tejidos mediante hibndación, usando ADNc de la proteína bajo condiciones severas (60 a 70°C, 6xSSC)

En la presente invención, una variante de proteína se define como una proteína que se obtiene sustituyendo, eliminando, añadiendo o
10 insertando uno o más aminoácidos en la proteína original, y tiene aun por lo menos parte de la actividad de la proteína original, a un nivel detectable

De preferencia, la proteína o un análogo o variante de la misma es una proteína básica. Más preferiblemente, la proteína básica es un factor básico de crecimiento de fibroblastos (bFGF), un factor de crecimiento
15 epidérmico (EGF), un factor inhibidor de osteoclastogénesis (OCIF), un factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF), un factor neurotrófico derivado de cerebro (BDNF), un factor de crecimiento nervioso (NGF), una hormona de crecimiento humano (HGH), un factor de crecimiento de hepatocitos (HGF), o un factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF), o un análogo o una
20 variante de los mismos. Muy preferiblemente, la proteína básica es un factor inhibidor de osteoclastogénesis (OCIF), o un análogo o una variante del mismo.

El OCIF, un análogo del mismo o una variante del mismo usado

en la presente invención puede ser de tipo natural, o puede ser de tipo recombinante, y su origen no es particularmente limitado. 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 animal humano o no humano. OCIF de tipo recombinante, un análogo del mismo o una variante del mismo, es una proteína recombinante que se obtiene mediante extracción, purificación y/o aislamiento de dicha proteína de un hospedero usado convencionalmente en dichas técnicas, tales como una célula hospedera procarionótica (por ejemplo, *Escherichia coli*), o una célula eucarionótica 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 que se describen 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 usados en la presente invención no es particularmente limitado, y puede derivarse de un animal humano o no humano. De preferencia, pueden derivarse de un mamífero tal como un humano, rata, ratón, conejo, perro, gato, vaca, cerdo, oveja o cabra, o un ave tal como un ave doméstica, ganso, pollo o pavo. Más preferiblemente, se derivan de mamíferos, y muy preferiblemente se derivan de un humano.

El OCIF o análogo del mismo usado en la presente invención,

puede ser un OCIF de tipo monomérico (por ejemplo, en humanos, un monómero que tenga un peso molecular medido mediante SDS-PAGE bajo condiciones no reductoras, de alrededor de 60000), o un OCIF de tipo dimérico (por ejemplo, en humanos, un dímero que tenga un peso molecular de aproximadamente 120000 medido mediante SDS-PAGE bajo condiciones no reductoras) [véase documento EP-A-0816380 (WO-A-96/26217)] Es de preferencia un monómero de OCIF de humano que tenga un peso molecular de alrededor de 60,000 medido mediante SDS-PAGE bajo condiciones no reductoras, o un dímero de OCIF de humano que tenga un peso molecular de aproximadamente 120,000 medido mediante SDS-PAGE bajo condiciones no reductoras, y es más preferiblemente un dímero de OCIF de humano que tenga un peso molecular de alrededor de 120,000 medido mediante SDS-PAGE bajo condiciones no reductoras

Se sabe que el OCIF se traduce en las células como un polipéptido que contiene un péptido de señal en el extremo amino 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 usado en la presente invención, incluye el polipéptido que contiene un péptido de señal y la forma madurada del mismo. Ejemplos preferidos incluyen el OCIF de humano con el péptido de señal que tiene los aminoácidos -21 a +380 de SEQ ID NO 1 del listado de secuencias, y el OCIF maduro de humano sin el

péptido de señal que tiene los aminoácidos +1 a +380 de SEQ ID NO 1 del listado de secuencias. De éstos, se prefiere particularmente el OCIF maduro de humano.

Se sabe también que puede añadirse metionina a dicha forma
5 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 procariontica 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 codifique para una forma
10 madurada de 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 extremo amino de la misma, puede ser expresada entonces por una célula hospedera adecuada que haya sido transformada por dicho vector de expresión recombinante.
15 Además, un aminoácido o más de un aminoácido puede añadirse a dicha proteína en una posición cerca de la metionina del extremo amino mediante la adición de otros tripletes de nucleótidos cerca del triplete de ATG añadido en el extremo 5' del polinucleótido que codifica para una forma madurada del OCIF, un análogo del mismo o una variante del mismo. La forma madurada
20 objetivo del OCIF, un análogo del mismo, o una variante del mismo que tiene metionina en el extremo amino, puede purificarse y aislarse de un cultivo de la célula hospedera transformada de acuerdo con un método convencional. Además, un aminoácido o más de un aminoácido puede insertarse en la forma

OK

madurada del OCIF que tiene metionina en el extremo amino, un análogo del mismo o una variante del mismo en una posición adyacente a la metionina, y más cerca del extremo carboxi que la metionina

En la presente invención, un análogo de OCIF significa una

5 proteína codificada por un polinucleótido que existe naturalmente en las células, fluido corporal y/u órganos de un animal humano o no humano, tales como los ejemplificados anteriormente. Ejemplos preferidos específicos de dichos análogos incluyen OCIF2, OCIF3, OCIF4 y OCIF5 [véase documento EP-A-0816380 (WO96/26217)]. Dichos análogos de OCIF o fragmentos

10 activos de los mismos, pueden obtenerse mediante un método tal como el siguiente: se extrae ARN de una célula, órgano, tejido o fluido corporal de un animal humano o 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

15 cadena como molde usando una ADN polimerasa, el ADNc de doble cadena obtenido de esta manera, se inserta 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

20 entonces para su uso en una técnica de hibridación tal como hibridación en placas o hibridación de fagos usando ADNc de OCIF, o un fragmento del mismo como sonda, bajo condiciones severas [véase 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 de un
5 residuo de aminoácido ha sido sustituido en, eliminado de, añadido a, o insertado 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 pueden obtenerse, por ejemplo, mediante el siguiente método sustituyendo, eliminando, añadiendo y/o insertando un nucleótido o más de un
10 nucleótido en una secuencia de nucleótidos que codifique para OCIF o un análogo del mismo, usando un método de reacción en cadena de polimerasa (refendo en lo sucesivo como PCR), un método de recombinación genética o un método de digestión con nucleasa usando una exonucleasa o endonucleasa tal como una enzima de restricción, transformando una célula
15 hospedera eucariótica tal como una célula animal, o una célula hospedera procarionótica 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 de la fracción que contiene a la proteína producida por un cultivo de células de
20 dicho hospedero transformado, de acuerdo a un método bien conocido por los expertos en la técnica

Se sabe también que formas truncadas de OCIF, en donde una parte considerable de la secuencia de aminoácidos ha sido eliminada del

extremo carboxi de un polipéptido de OCIF, mantienen 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 parte de la actividad del polipéptido de OCIF completo, se

5 incluyen también en las variantes de OCIF de la presente invención

Además, se conoce un OCIF o una forma truncada del mismo que se fusiona con un dominio de inmunoglobulina tal como el dominio Fc (por ejemplo, un polipéptido de fusión en el cual el dominio Fc de IgG de humano se une al extremo carboxi del OCIF), y que retiene por lo menos parte de la

10 actividad del polipéptido de OCIF completo (véase documento WO-A-97/23614), y dichas proteínas de fusión se incluyen también en las variantes de OCIF de la presente invención

Cualquier OCIF producido en forma natural, o un análogo del mismo, u OCIF recombinante o análogo o variante del mismo, puede contener

15 una cadena de azúcar que se une al OCIF o análogo o variante del mismo después de la traducción Puede obtenerse OCIF producido en forma natural, o un análogo del mismo que contiene una cadena de azúcar, de cultivos de células, tejidos, órganos, fluidos corporales, o líneas de células derivadas de animales humanos o no humanos, usando técnicas convencionales Puede

20 obtenerse OCIF recombinante o un análogo o variante del mismo que contiene una cadena de azúcar, de un cultivo de una célula hospedera eucariótica transformada usando un vector que comprende una secuencia de nucleótidos que codifica para cualquier OCIF o un análogo o variante del

mismo, tales como los que se describieron y ejemplificaron anteriormente. Ejemplos de células hospederas adecuadas que pueden usarse y que son capaces de la modificación del OCIF o un análogo o variante del mismo después de la traducción, 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 contiene dicha cadena de azúcar, es adecuado para su uso en la formación de los complejos de la presente invención. La cadena de azúcar en el OCIF o un análogo o variante del mismo que contiene una cadena de azúcar, puede modificarse artificialmente (en particular, enzimáticamente) con polímeros, polisacáridos o polisacáridos modificados.

La composición farmacéutica de la presente invención que contiene un copolímero de la presente invención, o una sal farmacológicamente aceptable del mismo y una proteína o un análogo del mismo, puede ser una solución preparada de acuerdo a un método descrito anteriormente, o una obtenida deshidratando por congelación la solución. En forma alternativa, dicha composición farmacéutica puede formularse de acuerdo a un método alternativo, o puede estar en forma de un equipo. En el último caso, el copolímero de la presente invención o una sal farmacológicamente aceptable del mismo, y una proteína o un análogo o variante de la misma, se almacenan en contenedores diferentes, y se mezclan entonces para preparar la composición farmacéutica deseada poco antes de su uso.

Las composiciones farmacéuticas de la presente invención pueden comprender además adicionalmente una base. La base no se limita a alguna base específica, en tanto sea una base usada comúnmente en composiciones farmacéuticas. Ejemplos de dicha base incluyen bases

5 inorgánicas tales como carbonatos de metal alcalino (por ejemplo, carbonato de sodio, carbonato de potasio y carbonato de litio), carbonatos ácidos de metal alcalino (por ejemplo, carbonato ácido de sodio, carbonato ácido de potasio y carbonato ácido de litio), hidruros de metal alcalino (por ejemplo, hidruro de litio, hidruro de sodio e hidruro de potasio), hidróxidos de metal

10 alcalino (por ejemplo, hidróxido de sodio, hidróxido de potasio, hidróxido de bario e hidróxido de litio), fluoruros de metal alcalino (por ejemplo, fluoruro de sodio y fluoruro de potasio), y bases orgánicas tales como alcóxidos de metal alcalino (por ejemplo, metóxido de sodio, etóxido de sodio, metóxido de potasio, etóxido de potasio, t-butoxido de potasio y metóxido de litio),

15 mercaptanos de metal alcalino (por ejemplo, mercaptano sódico de metilo y mercaptano sódico de etilo), N-metil morfolina, trietilamina, tripropilamina, tributilamina, diisopropiletilamina, dicitclohexilamina, N-metilpiperidina, piperidina, 4-pirrolidinopiperidina, piperidina, 4-(N,N-dimetilamino)piperidina, 2,6-di(t-butil)-4-metilpiperidina, quinolina, N,N-dimetilanilina, N,N-diétilanilina, 1,5-

20 diazabicyclo[4.3.0]non-5-eno (DBN), 1,4-diazabicyclo[2.2.2]octano (DABCO) y 1,8-diazabicyclo[5.4.0]undec-7-eno (DBU). De estas bases, se prefieren los hidróxidos de metal alcalino, y se prefiere particularmente el hidróxido de sodio. A este respecto, se observará que todas las bases o algunas de las

mismas pueden formar sales con el copolímero de la presente invención

Ejemplos de la composición farmacéutica de conformidad con la presente invención, comprenden un complejo de por lo menos una sustancia seleccionada de un copolímero de la presente invención o una sal farmacológicamente aceptable del mismo y una proteína o un análogo o variante de la misma seleccionada de bFGF (usado para el tratamiento o prevención de enfermedad arteriopática isquémica y úlceras de piel intratables), EGF (usado para el tratamiento o prevención de enfermedades ulcerosas tales como colitis ulcerativa y trastorno epitelial córneo prolongado), PDGF (usado para el tratamiento de heridas), BDNF y NGF (usado para el tratamiento o prevención de enfermedades del sistema nervioso central tales como enfermedad de Parkinson y enfermedad de Alzheimer), HGH (usada para el tratamiento o prevención de deficiencia de hormona del crecimiento, síndrome de hiposecreción de hormona del crecimiento, síndrome de Turner y distrofia del cartílago), HGF (usado para el tratamiento o prevención de diabetes mellitus, arteriosclerosis, infarto cerebral y fibrosis hepática) y VEGF (usado para el tratamiento o prevención de enfermedad arteriopática isquémica y enfermedad oclusiva arterial periférica)

Un ejemplo particularmente preferido de la composición farmacéutica de conformidad con la presente invención, comprende un complejo de por lo menos una sustancia seleccionada de OCIF, un análogo y una variante del mismo, y por lo menos una sustancia seleccionada de un copolímero de la presente invención o una sal farmacológicamente aceptable

del mismo. Dicha composición farmacéutica es particularmente adecuada para la prevención o el tratamiento de enfermedades metabólicas óseas. En la presente invención, dichas enfermedades metabólicas óseas incluyen cualquier enfermedad que se caracterice por reducción sustancial de la masa ósea en el paciente que sufre de la misma, y en el cual es necesario suprimir la resorción ósea o la velocidad de resorción ósea para prevenir o tratar dichas enfermedades.

Las enfermedades metabólicas óseas que pueden tratarse o prevenirse usando la composición farmacéutica 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 (carcinoma de mama, cáncer pulmonar, cáncer renal y cáncer prostático), enfermedades malignas hematológicas (mieloma múltiple, linfoma y leucemia), hipercalcemia idiopática, hipercalcemia que acompaña a hipertiroidismo o mal funcionamiento renal, osteopenia que resulta de medicación de esteroides, osteopenia que resulta de administración de otros

medicamentos (por ejemplo, agentes inmunosupresores tales como metotrexato y ciclosporina A, heparina y antiepilépticos), osteopenia que acompaña a mal funcionamiento renal, osteopenia que acompaña a operación quirúrgica o enfermedades de órganos digestivos (por ejemplo, obstrucción de

5 intestino delgado, obstrucción de intestino grueso, hepatitis crónica, gastrectomía, cirrosis hepática biliar primaria y cirrosis hepática), osteopenia debida a varios tipos de reumatismo tales como artritis reumatoide, osteoclasia y destrucción de articulaciones debida a varios tipos de reumatismo tales como artritis reumatoide, artritis reumatoide tipo mutilante,

10 osteoartritis, pérdida de hueso periodontal, metástasis cancerosa de hueso (osteólisis, metástasis), 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 hipofosfatasa o diabetes,

15 osteopenia que acompaña a trastorno nutricional o trastorno de la alimentación, y otras osteopenias. Además, en la presente invención, la caquexia debida al carcinoma sólido mencionado anteriormente, metástasis cancerosa de hueso (osteólisis, metástasis) o enfermedades malignas hematológicas, se incluyen también en las enfermedades metabólicas óseas

20 (véase la solicitud de patente japonesa (Kokai) No 2000-178200)

La composición farmacéutica de conformidad con la presente invención como se describió anteriormente, puede administrarse con seguridad oralmente o no oralmente a un humano o animales diferentes de un

humano La forma de dosificación de la composición farmacéutica puede seleccionarse adecuadamente, dependiendo del tipo de enfermedad, el nivel de la enfermedad y la condición, edad, sexo y peso del paciente Por ejemplo, la composición farmacéutica puede administrarse oralmente en forma de tabletas, cápsulas, polvos, gránulos o jarabes, puede inyectarse en forma de una inyección intravenosa sola, o en combinación con un adyuvante común tal como glucosa, aminoácidos, o similares, o puede inyectarse intramuscularmente, subcutáneamente, intracutáneamente o intrapentonealmente sola, puede administrarse transdérmicamente en forma de cataplasma, puede administrarse transnasalmente en forma de gotas nasales, puede administrarse transmucosamente o a la cavidad oral en forma de una preparación transmucosa, o puede administrarse intrarrectalmente en forma de un supositorio Estas preparaciones pueden formularse en una forma convencional usando agentes auxiliares bien conocidos que se usan generalmente en el campo de medicina, tales como excipientes, agentes aglutinantes, desintegradores, lubricantes, agentes sabonzantes, solubilizadores, agentes de suspensión, colorantes, reguladores de pH, antisépticos, agentes de gelificación, agentes tensioactivos y agentes de recubrimiento

20 Cuando la composición farmacéutica se prepara en forma de una tableta, pueden usarse varios vehículos conocidos en la técnica Ejemplos de dichos vehículos incluyen excipientes tales como lactosa, sacarosa, cloruro de sodio, glucosa, urea, almidón, carbonato de calcio, caolín, celulosa

cristalina y ácido silícico, agentes aglutinantes tales como agua, etanol, propanol, jarabe simple, solución de glucosa, solución de almidón, solución de gelatina, carboximetilcelulosa, laca, metilcelulosa, fosfato de potasio y polivinilpirrolidona, desintegradores tales como almidón seco, alginato de sodio, agar en polvo, laminarén en polvo, carbonato ácido de sodio, carbonato de calcio, ésteres de ácido graso de polioxietilensorbitán, lauril sulfato de sodio, monoglicérido de ácido esteárico, almidón y lactosa, inhibidores de desintegración, tales como sacarosa, estearina, manteca de cacao y aceite hidrogenado, catalizadores de absorción tales como bases de amonio cuaternario y lauril sulfato de sodio, humectantes tales como glicerina y almidón, absorbentes tales como almidón, lactosa, caolín, bentonita y ácido silícico coloidal, y lubricantes tales como talco purificado, estearatos, ácido bórico en polvo y polietilenglicol. Además, dicha tableta puede cubrirse con un recubrimiento convencional, si es necesario. Ejemplos de dicha tableta recubierta incluyen tableta recubierta de azúcar, tableta recubierta de gelatina, una tableta recubierta de capa entérica, una tableta recubierta de película, una tableta de dos capas, y una tableta de capas múltiples.

Cuando la composición farmacéutica se prepara en forma de una píldora, pueden usarse varios vehículos conocidos en la técnica. Ejemplos de dichos vehículos incluyen excipientes tales como glucosa, lactosa, manteca de cacao, almidón, aceite vegetal hidrogenado, caolín y talco, agentes aglutinantes tales como goma arábiga en polvo, tragacanto en polvo, gelatina y etanol, y desintegradores tales como agar laminarén.

Cuando la composición farmacéutica se prepara en forma de un supositorio, pueden usarse varios vehículos conocidos en la técnica. Ejemplos de dichos vehículos incluyen polietilenglicol, manteca de cacao, alcoholes superiores, ésteres de alcoholes superiores, gelatina y glicéridos

5 semisintéticos

Cuando la composición farmacéutica se prepara en forma de una inyección, se prefiere que la composición en forma de una solución o una suspensión sea esterilizada, y se haga isotónica con la sangre. Cuando se prepara dicha composición en forma de una solución, una emulsión, una
10 suspensión o una solución acuosa sustancialmente homogénea, pueden usarse varios diluyentes conocidos en la técnica. Ejemplos de dichos diluyentes incluyen agua, etanol, propilenglicol, alcohol isoestearílico etoxilado, alcohol isoestearílico polioxilado y ésteres de ácido graso de polioxietilensorbitán. En este caso, la composición farmacéutica puede
15 contener además sal común, glucosa o glicina en una cantidad suficiente para mantener la isotonicidad con la sangre. Además, la composición farmacéutica puede contener también solubilizadores, agentes reguladores de pH, agentes sedantes, reguladores de pH, estabilizadores o agentes de solubilización convencionales. Dicha inyección puede ser deshidratada por
20 congelación

Además, la composición farmacéutica de la presente invención puede contener también colorantes, conservadores, perfumes, agentes sabonizantes, edulcorantes u otro medicamento, si se requiere.

La cantidad del complejo de OCIF o un análogo o variante del mismo y el copolímero o una sal farmacológicamente aceptable del mismo contenidos en la composición farmacéutica de la presente invención, no se limita a algún valor específico, pero está usualmente en la escala de 0.1 a 70% en peso, y de preferencia en la escala de 1 a 30% en peso

En la presente invención, la dosis del complejo de OCIF o un análogo o variante del mismo y el copolímero o una sal farmacológicamente aceptable del mismo contenidos en la composición farmacéutica de la presente invención, depende de varios factores que incluyen la condición y edad del paciente, la vía de administración y la forma del fármaco. En general, la cantidad administrada a un humano adulto por administración, está en una escala en el límite superior de 1 a 50 mg/kg, y un límite inferior de 0.001 a 0.1 mg/kg, en donde se prefiere la escala de 0.01 a mg/kg, y se prefiere más la escala de 0.1 a 1 mg/kg

La composición farmacéutica de conformidad con la presente invención debe administrarse una vez por varios meses, una vez por mes, una vez por varios días, una vez por día, o varias veces por día, dependiendo del tipo de ingredientes contenidos en la composición farmacéutica, la vía de administración, y la forma del fármaco. Cuando la composición comprende un complejo de OCIF, o un análogo o variante del mismo y un copolímero o una sal farmacológicamente aceptable del mismo para su uso como un agente para el tratamiento o prevención de enfermedades metabólicas óseas de conformidad con la presente invención, debe administrarse una vez por varios

meses, una vez por mes, una vez por varios días, una vez por día, o varias veces por día, dependiendo del tipo de ingrediente activo contenido en el agente para el tratamiento o prevención de enfermedades metabólicas óseas, la vía de administración y la forma del fármaco

5 El copolímero de la presente invención y sales farmacológicamente aceptables del mismo, son útiles como un modificador polimérico capaz de proveer un complejo que tiene propiedades uniformes, especialmente producción reducida de estructuras entrelazadas desorganizadas con la proteína, mejor manteniendo de la actividad de la
10 proteína y retención excelente de la proteína en la sangre después de la administración de dicho complejo. Esto lo hace particularmente útil como un modificador para modificar las propiedades farmacéuticas de proteínas que tienen actividad farmacéutica útil

15

EJEMPLOS

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. En los
20 siguientes ejemplos, m y R^3 son como se definieron anteriormente, para la fórmula (I), "relación de la composición" es la relación de la composición [es decir, la relación de las unidades estructurales (II) y (III)], "grado de polimerización promedio" es el grado de polimerización promedio del

copolímero preparado, y "relación de hidrólisis" es la relación de hidrólisis del copolímero preparado [es decir, la relación promedio de unidades estructurales, en donde R^3 es $-\text{OH}$ las unidades estructurales, en donde R^3 es diferente de $-\text{OH}$]

5

EJEMPLO 1

Preparación de hidrolizado de poli(PEG₅₀₀-MA) [poli(PEG₅₀₀-MA)h], en

donde m=6-16, $R^3=\text{OH}$, relación de la composición=1 1

aproximadamente, grado de polimerización promedio=30-40 y relación

10

de hidrólisis=10 0 aproximadamente (compuesto No 1)

Se usó como material de partida un copolímero de diéter alilmetílico de polioxietileno ($m = 6-16$, Alk = etileno, $R^1 = \text{hidrógeno}$ y $R^2 = \text{metilo}$) y anhídrido maleico, en donde la cadena lateral de polioxietileno tiene un peso molecular promedio de aproximadamente 500, y el grado de polimerización promedio de la cadena principal está en la escala de 30 a 40 [AM-0530K, fabricado por NOF Corporation (refendo en lo sucesivo como "poli(PEG₅₀₀-MA)"] Se añadieron 50 ml de agua destilada a 3 g de poli(PEG₅₀₀-MA) para disolver dicho material de partida, y la solución obtenida de esta manera se agitó a 40°C durante 15 horas. Se condensó la solución resultante usando una membrana de ultrafiltración hecha de poliétersulfona (teniendo un límite de peso molecular de 10,000, fabricada por Millipore Corporation, número de modelo PBGC07610), y el condensado resultante se

deshidrató por congelación para obtener 1.3 g del compuesto del título poli(PEG₅₀₀-MA)_n (compuesto No 1), como un compuesto oleoso

Se purificó poli(PEG₅₀₀-MA)_n (compuesto No 1) usando filtración en gel de la manera siguiente. Se disolvieron 100 mg de poli(PEG₅₀₀-MA)_n (compuesto No 1) en 4 ml de solución de hidróxido de sodio a 0.001 N. La solución se dividió en cuatro lotes, y cada lote de 1 ml se aplicó a una columna de filtración en gel (PD-10, fabricada por Amersham-Pharmacia). Se desechó el primer ml de eluyente. Se aplicaron entonces a cada columna 1.5 ml de solución de hidróxido de sodio a 0.001 N, y otros 1.5 ml fueron eluidos de la columna, y se desecharon. Se aplicaron entonces a cada columna 2.5 ml de solución de hidróxido de sodio a 0.001 N, y otros 2.5 ml fueron eluidos de la columna, y es esta fracción que contenía al poli(PEG₅₀₀-MA)_n (compuesto No 1) purificado. Se combinaron las fracciones purificadas de las cuatro columnas, para dar 10 ml de una solución purificada del compuesto del título. Se determinó que el rendimiento después del paso de purificación (determinado espectrofotométricamente midiendo la absorbancia de poli(PEG₅₀₀-MA)_n a 210 nm antes y después de la purificación) es de 80% (80 mg de polímero), y se determinó que la concentración en la solución purificada es de 8 mg/ml.

El contenido de grupos carboxilo del compuesto del título se determinó mediante titulación conductimétrica de la manera siguiente. Se obtuvieron 7.5 ml de la solución del compuesto del título purificado obtenido anteriormente (conteniendo 60 mg del compuesto del título) para un volumen

de 50 ml con agua destilada, y la solución obtenida de esta manera se ajustó a pH 12 con solución de hidróxido de sodio acuoso a 1 M. Se añadió a la solución ácido clorhídrico a 0.1 M en incrementos de 0.1 ml, siendo medidos el pH y la conductividad de la solución después de cada adición de ácido clorhídrico. Se calculó entonces el contenido de grupos carboxilo del copolímero a partir de la cantidad de ácido clorhídrico a 0.1 M añadida en la región de regulación de pH para conductividad (es decir, la región de la gráfica de conductividad contra la cantidad de ácido clorhídrico añadido, en donde los grupos carboxilo del copolímero del compuesto del título actúan como un regulador de pH, dicha región correspondiendo a una escala de pH de aproximadamente 10.5 a 3), la cantidad molar de ácido clorhídrico usado en la región de regulación de pH para conductividad, es igual a la cantidad molar de grupos carboxilo en el copolímero del compuesto del título. Como resultado, se determinó que el contenido de grupos carboxilo por 1 g del compuesto del título, es de 3.22 mmoles. A partir de esto, la relación de la composición fue calculada para ser de 1.107. Esta cifra se aplicó para los siguientes ejemplos en donde se utilizó el mismo material de partida.

EJEMPLO 2

20 **Preparación de hidrolizado de $\text{poly}(\text{PEG}_{1500}\text{-MA}) [\text{poly}(\text{PEG}_{1500}\text{-MA})_h]$, en donde $m=28-38$, $R^3=\text{OH}$, relación de la composición=1.1 aproximadamente, grado de polimerización promedio=10-15 y relación de hidrólisis=10.0 aproximadamente (compuesto No. 2)**

Se usó como material de partida un copolímero de diéter alilmetílico de polioxietileno ($m = 28-38$, $Alk = \text{etileno}$, $R^1 = \text{hidrógeno}$ y $R^2 = \text{metilo}$) y anhídrido maleico, en donde el polioxietileno tiene un peso molecular promedio de aproximadamente 1500, y el grado de polimerización promedio de la cadena principal está en la escala de 10-15 (AM-1510K, fabricado por NOF Corporation) [refendo en lo sucesivo como "poli(PEG₁₅₀₀-MA)"] Se añadieron 25 ml de agua destilada a 1.5 g de poli(PEG₁₅₀₀-MA) para disolver dicho material de partida, y la solución obtenida de esta manera se agitó a temperatura ambiente durante 20 horas. Al término de este período, la solución se condensó de la misma forma como se describió en el ejemplo 1 anterior, usando una membrana de ultrafiltración hecha de poliétersulfona (teniendo un límite de peso molecular de 10,000, fabricada por Millipore Corporation, número de modelo PBGC07610), y el condensado resultante se deshidrató por congelación para obtener 0.8 g del compuesto del título poli(PEG₁₅₀₀-MA)_n (compuesto No. 2), como un compuesto oleoso.

Se midió el contenido de grupos carboxilo del compuesto del título poli(PEG₁₅₀₀-MA)_n (compuesto No. 2) de la misma forma como se describió en el ejemplo 1 anterior y, como resultado, se determinó que el contenido de grupos carboxilo por 1 g del compuesto del título es de 1.63 mmoles. A partir de esto, la relación de la composición fue calculada para ser de 1:1.4. Esta cifra se aplicó para los siguientes ejemplos en donde se utilizó el mismo material de partida.

EJEMPLO 3**Preparación del producto de amonólisis de poli(PEG₅₀₀-MA) [poli(PEG₅₀₀-****MA)a)], en donde m=6-16, R¹=NH₂, relación de la composición=1 1****5 aproximadamente, grado de polimerización promedio=30-40 y relación**
de hidrólisis=0 10 aproximadamente (compuesto No 3)

Se añadieron 9.5 g de amoníaco acuoso (concentración de amoníaco 28% en peso) a 1 g de poli(PEG₅₀₀-MA) (AM-0530K, fabricado por

10 NOF Corporation) para disolver dicho material de partida, y la solución obtenida de esta manera se agitó a temperatura ambiente durante 16 horas. Al término de este período, la solución obtenida de esta manera se sometió a diálisis a través de una membrana de celulosa regenerada (que tenía un límite de peso molecular de 12,000 a 14,000, fabricada por Sanko Junyaku Co., Ltd.,

15 No. de modelo UC36-32-100) contra 1 l de una solución de ácido acético acuoso a 0.1% en peso durante 1 día, y se sometió entonces a diálisis contra 1 l de agua durante 1 día. Después de que se renovó 1 l de agua, se sometió adicionalmente a diálisis por otro día. Al llevar a cabo dicha diálisis, se eliminó el exceso de amoníaco del producto. La solución obtenida de esta manera se

20 condensó usando una membrana de ultrafiltración hecha de poliétersulfona (teniendo un límite de peso molecular de 10,000, y fabricada por Millipore Corporation, número de modelo PBGC07610), y el condensado resultante se deshidrató por congelación para obtener 0.99 g del compuesto del título.

poli(PEG₅₀₀-MA)a (compuesto No 3), como un compuesto oleoso

Se determinó el contenido de grupos carboxilo en 1 g de poli(PEG₅₀₀-MA)a (compuesto No 3) mediante titulación conductimétrica de la misma forma como se describió en el ejemplo 1 anterior y, como resultado, se determinó que el contenido de grupos carboxilo por 1 g del compuesto del título es de 1.55 mmoles

Bajo las condiciones de reacción usadas, es posible que el residuo de anhídrido maleico pueda someterse no sólo a una reacción de apertura de anillo debido a la amonólisis, sino también a hidrólisis por el agua presente en el sistema de reacción. La relación de residuos de anhídrido maleico sometidos a amonólisis, los residuos de anhídrido maleico sometidos a hidrólisis, se calculó de la manera siguiente

En el ejemplo 1, se determinó el contenido de grupos carboxilo en 1 g de poli(PEG₅₀₀-MA)h (compuesto No 1). Esto da el valor para el contenido de grupos carboxilo cuando todos los residuos de ácido maleico son totalmente hidrolizados (3.22 mmoles por 1 g de polímero). A partir de este resultado, se determinó mediante cálculo el peso de poli(PEG₅₀₀-MA)h (compuesto No 1) por mol de grupos carboxilo ($1/3.22 \times 10^{-3}$ g), y el peso de poli(PEG₅₀₀-MA)h (compuesto No 1) por mol de residuos de ácido maleico con apertura de anillo [2 x el peso de poli(PEG₅₀₀-MA)h (compuesto No 1) por mol de residuos de ácido maleico con apertura de anillo, puesto que existen dos grupos carboxilo por residuo de ácido maleico totalmente hidrolizado], dando los resultados de 311 g y 621 g, respectivamente. A partir de estos

valores, se determinó el peso de poli(PEG₅₀₀-MA) (es decir, el peso del copolímero antes de la hidrólisis) por gramo de grupo funcional, y el peso de poli(PEG₅₀₀-MA)_a (compuesto No 3) obtenido añadiendo amoníaco a poli(PEG₅₀₀-MA) por gramo de grupo funcional. Específicamente, se obtuvo el

5 peso de poli(PEG₅₀₀-MA) (es decir, el peso del copolímero antes de la hidrólisis) por mol de residuo de anhídrido maleico, restando el peso molecular de una molécula de agua (18 g) del peso del copolímero totalmente hidrolizado, dando una cantidad de 603 g. Se obtuvo el peso de poli(PEG₅₀₀-MA)_a (compuesto No 3) por mol de grupo carboxilo, añadiendo el peso

10 molecular de una molécula de amoníaco (17 g) al peso de poli(PEG₅₀₀-MA), dando una cantidad de 620 g. A partir de ese valor, se determinó mediante cálculo el contenido teórico de grupos carboxilo (1 g/620) por 1 g de poli(PEG₅₀₀-MA)_a (compuesto No 3), en donde todos los residuos de anhídrido maleico han sido sometidos a amoniólisis (es decir, sin hidrólisis), y

15 se encontró que es de 1.61 mmoles. A partir del contenido de grupos carboxilo por 1 g de poli(PEG₅₀₀-MA)_h (compuesto No 1), en donde todos los residuos de anhídrido maleico fueron sometidos a hidrólisis, el contenido teórico de grupos carboxilo por 1 g de poli(PEG₅₀₀-MA)_a (compuesto No 3), en donde todos los residuos de anhídrido maleico han sido sometidos a amoniólisis, y el

20 contenido real de grupos carboxilo por 1 g de poli(PEG₅₀₀-MA)_a (compuesto No 3) medido anteriormente (es decir, 1.55 mmoles), se calculó la relación de residuos de anhídrido maleico sometidos a amoniólisis en el compuesto del título: el número total de residuos de anhídrido maleico en el material de

partida, y se determinó que es de 10. De esta manera, se confirmó que sustancialmente todos los residuos de anhídrido maleico habían sido sometidos a amoníolisis, y que virtualmente ninguna hidrólisis había ocurrido.

5

EJEMPLO 4

Preparación del producto de reacción de dimetilamina y poli(PEG₅₀₀-MA)

[poli(PEG₅₀₀-MA)_{dma}]], en donde m=6-16, R¹=NMe₂, relación de la

composición=1:1 aproximadamente, grado de polimerización

promedio=30-40 y relación de hidrólisis=0:10 aproximadamente

10

(compuesto No. 4)

Se añadieron 71 g de una solución de dimetilamina acuosa (concentración de dimetilamina 50% en peso), a 10 g de poli(PEG₅₀₀-MA) (AM-0530K, fabricado por NOF Corporation) para disolverlo, y la solución obtenida de esta manera se agitó a temperatura ambiente durante 20 horas. Al término de este período, la solución obtenida de esta manera se sometió a diálisis a través de una membrana de celulosa regenerada (teniendo un límite de peso molecular de 12,000 a 14,000, y fabricada por Sanko Junyaku Co., Ltd., No. de modelo UC36-32-100) contra 10 litros de una solución de ácido acético acuoso a 0.1% durante 1 día, y se sometió entonces adicionalmente a diálisis contra 10 litros de agua durante 1 día. Después de que se renovaron 10 litros de agua, se sometió adicionalmente a diálisis por otro día. Al llevar a cabo dicha diálisis, se eliminó el exceso de dimetilamina del producto. La

solución obtenida de esta manera se condensó usando una membrana de ultrafiltración hecha de poliétersulfona (teniendo un límite de peso molecular de 10,000, y fabricada por Millipore Corporation, número de modelo PBGC07610), y el condensado resultante se deshidrató por congelación para
5 obtener 6.3 g del compuesto del título poli(PEG₅₀₀-MA)_{dma} (compuesto No 4), como un compuesto oleoso

Se determinó el contenido de grupos carboxilo en 1 g de poli(PEG₅₀₀-MA)_{dma} (compuesto No 4) de la misma forma como se describió en el ejemplo 1 anterior, y se determinó que es de 1.53 mmoles. Mediante el
10 uso de un cálculo similar al del ejemplo 3 para el producto de amonólisis, se determinó mediante cálculo el contenido teórico de grupos carboxilo en 1 g de poli(PEG₅₀₀-MA)_{dma} (compuesto No 4), en donde todos los residuos de anhídrido maleico habían sido sometidos a aminólisis, y se determinó que es de 1.54 mmoles. A partir de estos resultados, se calculó la relación de
15 residuos de anhídrido maleico sometidos a aminólisis en el compuesto del título: el número total de residuos de anhídrido maleico en el material de partida, y se determinó que es de 1.0. De esta manera, se confirmó que sustancialmente todos los residuos de anhídrido maleico habían sido sometidos a aminólisis por dimetilamina, y que virtualmente ninguna hidrólisis
20 había ocurrido

EJEMPLO 5

Preparación del producto de reacción de 1-amino-2-propanol y

poli(PEG₅₀₀-MA) [poli(PEG₅₀₀-MA)ipa], en donde m=6-16,

R³=NH(CH₂CH(OH)CH₃), relación de la composición=1 1

aproximadamente, grado de polimerización promedio=30-40 y relación

de hidrólisis=0 10 aproximadamente (compuesto No 5)

5

Se añadieron 14 g de 1-amino-2-propanol a 1 5 g de poli(PEG₅₀₀-MA) (AM-0530K, fabricado por NOF Corporation) para disolverlo, y la solución obtenida de esta manera se agitó a temperatura ambiente durante 16 horas. Al término de este período, se añadieron a la solución 300 ml de agua destilada, y se añadió adicionalmente ácido acético glacial para neutralizar la solución. La solución obtenida de esta manera se condensó usando una membrana de ultrafiltración hecha de poliétersulfona (teniendo un límite de peso molecular de 10,000 y fabricada por Millipore Corporation, número de modelo PBGC07610), para obtener 50 ml de condensado. Se añadieron al condensado 300 ml de agua destilada, y la solución resultante se condensó de nuevo de la misma forma. Este ciclo de dilución del condensado con agua destilada, seguido de recondensación, se repitió cinco veces para eliminar el exceso de 1-amino-2-propanol. El condensado resultante se deshidrató por congelación para obtener 1 3 g del compuesto del título poli(PEG₅₀₀-MA)ipa (compuesto No 5), como un compuesto oleoso.

Se determinó el contenido de grupos carboxilo en 1 g de poli(PEG₅₀₀-MA)ipa (compuesto No 5) de la misma forma como se describió en el ejemplo 1 anterior, y se determinó que es de 1 55 mmoles. Mediante el

uso de un cálculo similar al del ejemplo 3 para el producto de amonólisis, se determinó mediante cálculo el contenido teórico de grupos carboxilo en 1 g de poli(PEG₅₀₀-MA)ipa (compuesto No 5), en donde todos los residuos de anhídrido maleico habían sido sometidos a aminólisis, y se determinó que es de 1.47 mmoles. A partir de estos resultados, se calculó la relación de residuos de anhídrido maleico sometidos a aminólisis en el compuesto del título: el número total de residuos de anhídrido maleico en el material de partida, y se determinó que es de 1.0. De esta manera, se confirmó que sustancialmente todos los residuos de anhídrido maleico en el material de partida habían sido sometidos a aminólisis por 1-amino-2-propanol, y que virtualmente ninguna hidrólisis había ocurrido.

EJEMPLO 6

Producto de la reacción de alcoholólisis entre etanol y poli(PEG₅₀₀-MA)

15 **[poli(PEG₅₀₀-MA)_{ea}], en donde m=6-16, R³=OCH₂CH₃, relación de la composición=1.1 aproximadamente, grado de polimerización promedio=30-40 y relación de hidrólisis=4.6 aproximadamente (compuesto No. 6)]**

20 Se añadieron 25 g de etanol absoluto a 1.5 g de poli(PEG₅₀₀-MA) (AM-0530K, fabricado por NOF Corporation) para disolverlo, y la solución obtenida de esta manera se agitó a temperatura ambiente durante 16 horas. Al término de este período, se añadieron 300 ml de agua, y la solución

resultante se condensó usando una membrana de ultrafiltración hecha de poliétersulfona (teniendo un límite de peso molecular de 10,000 y fabricada por Millipore Corporation, número de modelo PBGC07610), para obtener 50 ml de condensado. Se añadieron 300 ml de agua destilada al condensado, y la solución resultante se condensó de nuevo de la misma forma. Este ciclo de dilución del condensado con agua destilada, seguido de recondensación, se repitió cinco veces para eliminar el exceso de etanol. El condensado resultante se deshidrató por congelación para obtener 0.8 g del compuesto del título poli(PEG₅₀₀-MA)ea (compuesto No. 6), como un compuesto oleoso.

Se determinó el contenido de grupos carboxilo en 1 g de poli(PEG₅₀₀-MA)ea (compuesto No. 6) de la misma forma como se describió en el ejemplo 1 anterior, y se determinó que es de 2.16 mmoles. Mediante el uso de un cálculo similar al del ejemplo 3 para el producto de amonólisis, se determinó mediante cálculo el contenido teórico de grupos carboxilo en 1 g de poli(PEG₅₀₀-MA)ea (compuesto No. 6), en donde todos los residuos de anhídrido maleico habían sido sometidos a alcoholólisis, y se determinó que es de 1.47 mmoles. A partir del resultado, se calculó la relación de residuos de anhídrido maleico en el compuesto del título sometidos a alcoholólisis, el número total de residuos de anhídrido maleico en el material de partida, y se determinó que es de 0.6. De esta manera, puede observarse que 60% de los residuos de anhídrido maleico en el material de partida fueron sometidos a alcoholólisis, y que el 40% restante de los residuos de anhídrido maleico se sometió a hidrólisis.

EJEMPLO 7**Preparación del producto de amonólisis de poli(PEG₁₅₀₀-MA)****[poli(PEG₁₅₀₀-MA)a], en donde m=28-38, R³=NH₂, relación de la****composición=1 1 aproximadamente, grado de polimerización****promedio=10-15 y relación de hidrólisis=4 6 aproximadamente****(compuesto No 7)**

Se añadieron 14.5 g de amoníaco acuoso (concentración de amoníaco 28% en peso) a 1.5 g de poli(PEG₁₅₀₀-MA) (AM-1510K, fabricado por NOF Corporation) para disolverlo, y la solución obtenida de esta manera se agitó a temperatura ambiente durante 20 horas. Al término de este periodo, se añadieron a la solución 300 ml de agua destilada, y se añadió adicionalmente ácido acético glacial para neutralizar dicha solución. La solución resultante se condensó usando una membrana de ultrafiltración hecha de polietersulfona (teniendo un límite de peso molecular de 10,000 y fabricada por Millipore Corporation, número de modelo PBGC07610), para obtener 50 ml de condensado. Se añadieron al condensado 300 ml de agua destilada, y la solución resultante se condensó de nuevo de la misma forma. Este ciclo de dilución del condensado con agua destilada, seguido de recondensación, se repitió cinco veces para eliminar el exceso de amoníaco. El condensado resultante se deshidrató por congelación para obtener 0.7 g del compuesto del título poli(PEG₁₅₀₀-MA)a (compuesto No 7), como un

compuesto oleoso

Se determinó el contenido de grupos carboxilo en 1 g de poli(PEG₁₅₀₀-MA)_a de la misma forma como en el ejemplo 1, y se encontró que es de 1.12 mmoles. Como en el caso de la amonólisis del poli(PEG₅₀₀-MA)_a del ejemplo 3, existe la posibilidad de que los residuos de anhídrido maleico en el material de partida de poli(PEG₁₅₀₀-MA) puedan someterse a amonólisis e hidrólisis. Por lo tanto, la relación de residuos de anhídrido maleico sometidos a amonólisis a la relación de residuos de anhídrido maleico sometidos a hidrólisis, se calculó de la manera siguiente

En el ejemplo 2, se determinó el contenido de grupos carboxilo en 1 g de poli(PEG₁₅₀₀-MA)_h (compuesto No. 2). Esto da el valor para el contenido de grupos carboxilo, cuando todos los residuos de ácido maleico son totalmente hidrolizados (1.63 mmoles por 1 g de polímero). A partir de este resultado, se calculó el peso de poli(PEG₁₅₀₀-MA)_h (compuesto No. 2) por mol de grupos carboxilo ($1/1.63 \times 10^{-3}$ g), y el peso de poli(PEG₁₅₀₀-MA)_h (compuesto No. 2) por mol de residuos de ácido maleico con apertura de anillo [$2 \times$ el peso de poli(PEG₁₅₀₀-MA)_h (compuesto No. 2) por mol de residuos de ácido maleico con apertura de anillo, puesto que existen dos grupos carboxilo por residuo de ácido maleico totalmente hidrolizado], dando los resultados de 613 g y 1,227 g, respectivamente. A partir del peso de poli(PEG₁₅₀₀-MA)_h obtenido de esta manera, y usando un procedimiento similar al del ejemplo 3 anterior, se calculó el contenido teórico de grupos carboxilo por 1 g de poli(PEG₁₅₀₀-MA)_a (compuesto No. 7), en donde todos los

residuos de anhídrido maleico habían sido sometidos a amoniólisis, y se determinó que es de 0.82 mmoles. A partir de estos valores y el contenido real de grupos carboxilo de poli(PEG₁₅₀₀-MA)_a (compuesto No. 7) medido anteriormente (1.12 mmoles), se determinó mediante cálculo la relación de

5 residuos de anhídrido maleico en el compuesto del título sometidos a amoniólisis. El número total de residuos de anhídrido maleico en el material de partida, y se encontró que es de 0.6. De esta manera, se confirmó que 60% de los residuos de anhídrido maleico en el material de partida de poli(PEG₁₅₀₀-MA) fueron sometidos a amoniólisis, y que el 40% restante de los residuos de

10 anhídrido maleico fueron sometidos a hidrólisis.

EJEMPLO 8

Preparación del producto de reacción de dimetilamina y poli(PEG₁₅₀₀-MA)

[poli(PEG₁₅₀₀-MA)_{dma}], en donde m=28-38, R³=NMe₂, relación de la

15 **composición=1:1 aproximadamente, grado de polimerización**

promedio=10-15 y relación de hidrólisis=0.10 aproximadamente

(compuesto No. 8)

Se añadieron 11 g de una solución de dimetilamina acuosa

20 (teniendo una concentración de 50% en peso) a 1 g de poli(PEG₁₅₀₀-MA) (AM-1510K, fabricado por NOF Corporation) para disolverlo, y la solución obtenida de esta manera se agitó a temperatura ambiente durante 20 horas. Al término de este período, se añadieron a la solución 300 ml de agua destilada, y se

añadió adicionalmente ácido acético glacial para neutralizar la solución. La solución resultante se condensó usando una membrana de ultrafiltración hecha de poliétersulfona (teniendo un límite de peso molecular de 10,000 y fabricada por Millipore Corporation, número de modelo PBGC07610), para
5 obtener 50 ml de condensado. Se añadieron al condensado 300 ml de agua destilada, y la solución resultante se condensó de nuevo de la misma forma. Este ciclo de dilución del condensado con agua destilada, seguido de recondensación, se repitió cinco veces para eliminar el exceso de dimetilamina. El condensado resultante se deshidrató por congelación para
10 obtener el compuesto del título poli(PEG₁₅₀₀-MA)_{dma} (compuesto No 8), como un compuesto oleoso.

Se determinó el contenido de grupos carboxilo en 1 g de poli(PEG₁₅₀₀-MA)_{dma} (compuesto No 8) de la misma forma como en el ejemplo 1, y se calculó que es de 0.82 mmoles. Mediante el uso de un
15 procedimiento similar al usado en el ejemplo 3, se determinó mediante cálculo que el contenido teórico de grupos carboxilo en 1 g de poli(PEG₁₅₀₀-MA)_{dma}, en donde todos los residuos de anhídrido maleico habían sido sometidos a aminólisis, es de 0.80 mmoles. A partir de estos resultados, se determinó mediante cálculo la relación de residuos de anhídrido maleico en el
20 compuesto del título sometidos a aminólisis: el número total de residuos de anhídrido maleico en el material de partida, y se encontró que es de 1.0. De esta manera, se confirmó que sustancialmente todos los residuos de anhídrido maleico habían sido sometidos a aminólisis por dimetilamina.

EJEMPLO 9**Preparación de complejos de modificadores poliméricos de los ejemplos****1 a 8 con OCIF**

5

Cada uno de los modificadores poliméricos preparados en los ejemplos 1 a 8, se disolvió en solución salina regulada en su pH con fosfato (PBS), pH 6.0 (que es una solución que se obtiene mezclando una solución que contiene fosfato ácido disódico a 10 mM y cloruro de sodio a 150 mM y una solución que contiene fosfato diácido de sodio a 10 mM y cloruro de sodio a 150 mM a una relación adecuada, para dar un regulador de pH que tiene un pH de 6.0), para preparar soluciones que tuvieran una concentración de modificador de 1 a 20 mg/ml. Para cada solución de cada modificador en turno, se mezclaron 0.625 ml de la solución del modificador polimérico preparado y 0.625 ml de una solución que contenía OCIF maduro purificado de humano (OCIF preparado como se describe en los documentos WO 96/26217 y EP 816380) [concentración de proteína 2 mg/ml, medio PBS (pH 6.0)], y la mezcla obtenida de esta manera se dejó reposando a 4°C a 37°C durante por lo menos una hora, para dar una serie de soluciones [medio PBS (pH 6.0)] que contenían OCIF modificado con los modificadores poliméricos de los ejemplos 1 a 8, en los cuales la relación de modificador OCIF en cada solución se determinó mediante la concentración de la solución de modificador añadida y las condiciones de reacción. Las relaciones en peso de

10

15

20

modificador/OCIF para algunos de los complejos preparados (y las condiciones bajo las cuales se prepararon), se muestran en el cuadro 6 del ejemplo de prueba 2 más adelante. Se midió el tamaño molecular de cada uno de los complejos resultantes como se explica en el ejemplo de prueba 11 más adelante. El índice de detección de OCIF mediante ELISA en los complejos, se midió como se describe en el ejemplo de prueba 3 más adelante.

Además, para cada uno de los modificadores poliméricos, se preparó de la misma forma una solución de OCIF modificado con el modificador polimérico, salvo que se usó como medio PBS con un pH de 7.4.

10

EJEMPLO 10

Preparación de sal sódica del producto de amonólisis de poli(PEG₅₀₀-MA) [poli(PEG₅₀₀-MA)_n-Na], en donde m=6-16, R¹=NH₂, relación de la composición=1:1 aproximadamente, grado de polimerización

promedio=30-40 y relación de hidrólisis=3:1:6:9 aproximadamente

(compuesto No. 9)

Se usó como material de partida un copolímero de diéster alifático de polioxietileno (m = 6-16, Alk = etileno, R¹ = hidrógeno y R² = metilo) y anhídrido maleico, en donde la cadena lateral de polioxietileno tiene un peso molecular promedio de aproximadamente 500, y el grado de polimerización promedio de la cadena principal está en la escala de 30 a 40 (AM-0530K, fabricado por NOF Corporation, teniendo el número de lote

20

M34529) [refendo en lo sucesivo como "poli(PEG₅₀₀-MA)"] Se añadieron 61 ml de una solución de amoníaco a 0.5 M/1,4-dioxano a 10.1 g de dicho material de partida de poli(PEG₅₀₀-MA), y la solución resultante se agitó a 25°C durante 20 horas. Al término de este período, se añadieron a la solución 200 ml de éter dietílico y 100 ml de una solución acuosa de hidróxido de sodio a 0.2 M, y la mezcla se agitó vigorosamente por alrededor de 3 minutos. Después de permitir la separación de fase de las capas orgánica y acuosa, se recogió la capa inferior. Se añadieron 200 ml de éter dietílico y 60 ml de 1,4-dioxano a la capa recogida, y la solución obtenida de esta manera se agitó de nuevo vigorosamente. Después de la separación de fase, la capa inferior resultante se recogió, y se deshidrató por congelación para obtener 10.1 g del compuesto del título, sal sódica de poli(PEG₅₀₀-MA)a (compuesto No 9), como un sólido de color amarillo.

El contenido de grupos carboxilo y la relación de hidrólisis para el polímero del título, se determinaron como se describe en el ejemplo de prueba 1 más adelante.

EJEMPLO 11

Preparación del producto de amonólisis de poli(PEG₅₀₀-MA) [poli(PEG₅₀₀-MA)a], en donde m=6-16, R³=NH₂, relación de la composición=1.1 aproximadamente, grado de polimerización promedio=30-40 y relación de hidrólisis=1.486 aproximadamente (compuesto No 10)

Se añadieron 9.5 g de amoníaco acuoso a 28% en p/p a 1 g de poli(PEG₅₀₀-MA) (AM-0530K, fabricado por NOF Corporation, teniendo el número de lote M34529) para disolverlo, y la solución obtenida de esta manera se agitó a 25°C durante 4 horas. Al término de este período, se añadieron 250 ml de amoníaco acuoso a 0.28%, y la solución resultante se condensó usando una membrana de ultrafiltración hecha de poliétersulfona (teniendo un límite de peso molecular de 10,000 y fabricada por Millipore Corporation, número de modelo PBGC07610), y el condensado obtenido de esta manera se deshidrató por congelación para obtener 0.8 g del compuesto del título, poli(PEG₅₀₀-MA)_a (compuesto No. 10), como un compuesto oleoso.

El contenido de grupos carboxilo y la relación de hidrólisis para el polímero del título, se determinaron como se describe en el ejemplo de prueba 1 más adelante.

15

EJEMPLO 12

Preparación del producto de reacción de dimetilamina y poli(PEG₅₀₀-MA)

[sal sódica de poli(PEG₅₀₀-MA)_{dma}]], en donde m=6-16, R³=NMe₂,

relación de la composición=1.1 aproximadamente, grado de

polimerización promedio=30-40 y relación de hidrólisis=2.97.1

20

aproximadamente (compuesto No. 11)

Se añadieron 35 g de una solución de dimetilamina acuosa a 50% en p/p a 5 g de poli(PEG₅₀₀-MA) (AM-0530K, número de lote M34529

obtenido de NOF Corporation) para disolverlo, y la solución resultante se agitó a 25°C durante 3 horas, y se agitó adicionalmente a 4°C durante 16 horas. Al término de este período, se añadieron 100 ml de una solución acuosa de hidróxido de sodio a 0.1 M, y la solución obtenida de esta manera se deshidrató por congelación para obtener 5.4 g del compuesto del título, sal sódica de poli(PEG₅₀₀-MA)_{dma} (compuesto No. 11), como un sólido de color amarillo.

El contenido de grupos carboxilo y la relación de hidrólisis para el polímero del título, se determinaron como se describe en el ejemplo de prueba 1 más adelante.

EJEMPLO 13

Preparación de hidrolizado de poli(PEG₅₀₀-MA) [poli(PEG₅₀₀-MA)_h], en donde m=6-16, R³=OH, relación de la composición=1.1 aproximadamente, grado de polimerización promedio=30-40 y relación de hidrólisis=10.0 aproximadamente (compuesto No. 12)

Se añadieron 17 ml de agua destilada a poli(PEG₅₀₀-MA) (AM-0530K, fabricado por NOF Corporation, teniendo el número de lote M34529) para disolverlo, y la solución resultante se agitó a 40°C durante 4 horas. Al término de este período, se añadieron 250 ml de amoníaco acuoso a 0.28% en p/p, y la solución obtenida de esta manera se condensó usando una membrana de ultrafiltración hecha de polietérsulfona (teniendo un límite de

peso molecular de 10,000 y fabricada por Millipore Corporation, numero de modelo PBGC07610) El condensado obtenido de esta manera se deshidrató por congelación, para obtener 0.7 g del compuesto del título, poli(PEG₅₀₀-MA)_n (compuesto No 12), como un compuesto oleoso

- 5 El contenido de grupos carboxilo y la relación de hidrólisis para el polímero del título, se determinaron como se describe en el ejemplo de prueba 1 más adelante

EJEMPLO 14

10 Preparación de complejos de modificadores poliméricos de los ejemplos 10 a 13 con OCIF

- Cada uno de los modificadores poliméricos preparados en los ejemplos 10 a 13, se disolvió en solución salina regulada en su pH con fosfato (PBS), pH 7.0 (que es una solución que se obtiene mezclando una solución que contiene fosfato ácido disódico a 10 mM y cloruro de sodio a 150 mM, y una solución que contiene fosfato diácido de sodio a 10 mM y cloruro de sodio a 150 mM a una relación adecuada, para dar un regulador de pH que tiene un pH de 7.0), para preparar soluciones que tienen una escala de concentraciones del modificador en la escala de 1.25 a 105 mg/ml. Para cada modificador polimérico en turno, se mezclaron las soluciones del modificador polimérico obtenidas de esta manera y una solución que contenía OCIF maduro purificado de humano (OCIF preparado como se describe en los

documentos WO 96/26217 y EP 816380) [concentración de proteína 0.25 a 14 mg/ml, medio PBS (pH 6.0)] a una relación de 1:1 en volumen, para dar soluciones que tenían diferentes relaciones en peso entre el modificador y OCIF. Las soluciones obtenidas de esta manera se ajustaron a pH 5.0, 5.5, 6.0, 6.5, 7.0 o 7.4 usando una solución de ácido clorhídrico a 1 M o hidróxido de sodio acuoso a 1 M. Cada una de las soluciones obtenidas de esta manera se dejó reposando a 25°C entre 12 horas y una semana, para obtener una solución de un complejo del modificador polimérico de la presente invención y OCIF. Las soluciones preparadas se almacenaron a 4°C. El tamaño molecular de los complejos resultante se midió como se explica en los ejemplos de prueba 6 y 11 más adelante. El índice de detección de OCIF mediante ELISA en los complejos, se midió como se describe en el ejemplo de prueba 8 más adelante.

15

EJEMPLO 15

Preparación de sal sódica del producto de amoníólisis de poli(PEG₅₀₀-MA) [sal sódica de poli(PEG₅₀₀-MA)_n] que tiene un tamaño molecular controlado, en donde m=6-16, R³=NH₂, relación de la composición=1:1 aproximadamente, grado de polimerización promedio como se muestra a continuación, y relación de hidrólisis=1.486 aproximadamente (compuestos Nos 13-19)

20

Se disolvieron 100 mg de la sal sódica de poli(PEG₅₀₀-MA)_n

(compuesto No 9) obtenida en el ejemplo 10, en 1 ml de una solución salina regulada en su pH con fosfato (PBS que tenía un pH de 7.4, obtenida mezclando una solución acuosa que contenía 10 mM de fosfato ácido disódico y 150 mM de cloruro de sodio con una solución acuosa que contenía 10 mM de fosfato diácido de sodio y 150 mM de cloruro de sodio a una relación adecuada) La solución obtenida de esta manera se fraccionó mediante cromatografía de filtración en gel. Se usaron dos diferentes condiciones de filtración en gel, como se muestra a continuación

(1) Método de fraccionamiento usando Superose 6 (refendo en lo sucesivo como el método de SRF)

Columna Superose 6 HR 10/30 Amersham Bioscience

Temperatura de la columna 8°C

Fase móvil PBS (pH 7.4)

Longitud de onda para la detección 280 nm

Velocidad de flujo 0.3 ml/min

Cantidad inyectada a la columna 100 µl

(2) Método de fraccionamiento usando Superdex 200 (refendo en lo sucesivo como el método de SDF)

Columna Superdex 200 HR 16/60 Amersham Bioscience

Temperatura de la columna temperatura ambiente

Fase móvil PBS (pH 7.4)

Longitud de onda para la detección 280 nm

Velocidad de flujo 2 ml/min

Cantidad inyectada a la columna 5 ml

Los modificadores poliméricos que fueron eluidos mediante estos dos métodos de fraccionamiento en un tiempo de elución de x a y minutos, se definieron como $\text{poli(PEG}_{500}\text{-MA)}_a\text{-Na(SRF}_{x-y})$ y $\text{poli(PEG}_{500}\text{-MA)}_a\text{-Na(SDF}_{x-y})$,

5 respectivamente

Se determinó la concentración del modificador polimérico en cada fracción (solución acuosa) mediante cromatografía de líquidos de alto rendimiento. Las condiciones usadas en la cromatografía de líquidos de alto rendimiento, son las siguientes

10 Columna Shodex OHpak SB-806M HQ (disponible de SHOWA DENKO K K)

Columna de protección Shodex OHpak SB-G (disponible de SHOWA DENKO K K)

Temperatura de la columna 40°C

15 Fase móvil solución acuosa de fosfato ácido disódico a 50 mM ajustado a pH 7.0 con ácido clorhídrico a 1 M

Longitud de onda para la detección 210 nm

Velocidad de flujo 0.5 ml/min

Cantidad inyectada a la columna 50 µl

20 El $\text{poli(PEG}_{500}\text{-MA)}_a\text{-Na(SRF}_{x-y})$ y el $\text{poli(PEG}_{500}\text{-MA)}_a\text{-Na(SDF}_{x-y})$ obtenidos respectivamente mediante fraccionamiento de acuerdo al método de SRF y el método de SDF, fueron sometidos a otra cromatografía de filtración en gel (método de SRF) usando las mismas condiciones de elución

descritas anteriormente para el primer fraccionamiento de acuerdo al método de SRF, para evaluar el tamaño molecular de cada una de las muestras después del fraccionamiento. Cada una de las proteínas que tenía un peso molecular conocido (disponible de Amersham Bioscience), se usó como muestra patrón. A este respecto, se muestra el peso molecular y el tamaño molecular de cada una de las proteínas en el catálogo relevante del cual se adquirieron.

El tamaño molecular calculado de los modificadores poliméricos obtenidos mediante fraccionamiento, se muestra en el cuadro 1 siguiente.

CUADRO 1

		Peso molecular	Radio de Stokes (nm)	Tiempo de retención (min)	
	Proteína patrón				
5	Tioglobulina	669 k	8 50	38 48	
	Ferritina	440 k	6 10	44 85	
	Catalasa	232 k	5 22	48 77	
	Aldolasa	158 k	4 81	50 11	
	Albúmina	67 k	3 55	51 85	
	Ovoalbumina	43 k	3 05	53 95	
	Quimotripsinógeno A	25 k	2 09	59 26	
	Ribonucleasa A	13 7 k	1 64	60 23	
	Modificador del ejemplo 15				Compuesto No
10	Poli(PEG ₅₀₀ -MA) _n -Na (no fraccionado)		9 3 o menos**	35-65*	9
	Poli(PEG ₅₀₀ -MA) _n -Na (SRF ₅₀₋₅₅) rendimiento, 23%		3 1-6 2**	45-55*	13
	Poli(PEG ₅₀₀ -MA) _n -Na (SRF ₅₅₋₆₀) rendimiento, 29%		1 5-4 7**	50-60*	14
	Poli(PEG ₅₀₀ -MA) _n -Na (SRF ₆₀₋₆₅) rendimiento, 12%		3 1 o menos**	55-65*	15
15	Poli(PEG ₅₀₀ -MA) _n -Na (SDF ₄₈₋₅₂) rendimiento, 22%		7 8 o menos**	40-65*	16
	poli(PEG ₅₀₀ -MA) _n -Na (SDF ₅₂₋₅₈) rendimiento, 22%		6 2 o menos**	45-65*	17
	poli(PEG ₅₀₀ -MA) _n -Na (SDF ₅₈₋₆₄) rendimiento, 13%		3 1 o menos**	55-65*	18
	poli(PEG ₅₀₀ -MA) _n -Na (SDF ₆₀₋₇₀) rendimiento, 13%		3 1 o menos**	55-65*	19

*La presencia de un espacio del tiempo de retención, indica que la muestra tiene una distribución de peso molecular

**Este es un valor calculado a partir de una curva de calibración

producida usando el tamaño molecular y el tiempo de retención de cada una de las proteínas patrón. En los casos en donde no se muestra un límite inferior, es decir, en donde el radio de Stokes se muestra como "XX o menos", puede decirse que la muestra contiene un componente de bajo peso molecular que no puede evaluarse mediante cromatografía de filtración en gel

5 llevada a cabo bajo las condiciones de este ejemplo

Mediante el uso de este procedimiento, se prepararon varios polímeros de poli(PEG₅₀₀-MA)_n-Na que tenían diferentes tamaños moleculares

10 (compuestos Nos 13-19). Se calculó el grado de polimerización promedio de los compuestos Nos 13, 14, 15, 16, 17, 18 y 19 como en los ejemplos anteriores, y se encontró que es de <30, <<30, <<<30, <30, <<30, <<<30 y <<<30, respectivamente

15

EJEMPLO 16

Preparación del producto de amonólisis de poli(PEG₁₅₀₀-MA)
[poli(PEG₁₅₀₀-MA)_n] que tiene un tamaño molecular controlado, en donde
m=28-38, R³=NH₂, relación de la composición=1:1 aproximadamente, y el
grado de polimerización promedio es como se da a continuación

20

(compuestos Nos 20-22)

Partiendo con [poli(PEG₁₅₀₀-MA)_n] (compuesto No 7) preparado en el ejemplo 7 anterior como material de partida, y usando el mismo

procedimiento usado en el ejemplo 15 anterior, se preparó poli(PEG₁₅₀₀-MA)_n(SRF_{x-y}) de la misma forma como en el ejemplo 15 Las condiciones de elución para las eluciones de SRF, fueron iguales a las del ejemplo 15 Los rendimientos de los modificadores poliméricos obtenidos mediante

5 fraccionamiento, se muestran en el cuadro 2 siguiente

CUADRO 2

	Modificador del ejemplo 16	Compuesto No
	poli(PEG ₁₅₀₀ -MA) _n (no fraccionado)	7
10	poli(PEG ₁₅₀₀ -MA) _n (SRF ₅₀₋₅₅) 12 2%	20
	poli(PEG ₁₅₀₀ -MA) _n (SRF ₅₅₋₆₀) 13 1%	21
	poli(PEG ₁₅₀₀ -MA) _n (SRF ₆₀₋₆₅) 16 4%	22

Mediante el uso de este procedimiento, se prepararon varios

15 polímeros de poli(PEG₁₅₀₀-MA)_n que tenían diferentes tamaños moleculares (compuestos Nos 20-22) Se calculó el grado de polimerización promedio de los compuestos Nos 20, 21 y 22 como en los ejemplos anteriores, y se encontró que es de <10, <<10 y <<<10, respectivamente

20 **EJEMPLO 17**

Preparación de complejos de modificadores poliméricos de los ejemplos 15 y 16 con OCIF

Se prepararon complejos de polímero-OCIF de la presente invención como soluciones acuosas, usando esencialmente el mismo procedimiento preparativo como en el ejemplo 14 anterior, usando soluciones acuosas de los compuestos Nos 13 a 26 preparadas en los ejemplos 15 y 16 anteriores (medio PBS teniendo un pH de 7.4) y una solución acuosa de OCIF maduro purificado de humano (OCIF preparado como se describe en los documentos WO 96/26217 y EP 816380) (medio PBS teniendo un pH de 6.0) como los materiales de partida. Más específicamente, para cada uno de los modificadores, se mezcló una solución de 0.5 mg/ml de los mismos en PBS (pH 6.0) (preparada como se describió en el ejemplo 9 anterior) con una solución de 0.5 mg/ml de OCIF en PBS (pH 6.0) a una relación en volumen de 1:1. Las mezclas de reacción resultantes se dejaron reposando a 25°C durante 7 días. El tamaño molecular de los complejos resultantes se midió como se explica en el ejemplo de prueba 11 más adelante.

15

EJEMPLO 18

Preparación del producto de amonólisis de poli(PEG₅₀₀-MA) [sal sódica de poli(PEG₅₀₀-MA)_n] que tiene un tamaño molecular controlado (a) m=6-16, R³=NH₂, relación de la composición=1.2 aproximadamente y grado de polimerización promedio=20-30 (compuesto No. 27) y (b) m=6-16, R³=NH₂, relación de la composición=1.1 aproximadamente y grado de polimerización promedio=15 aproximadamente (compuesto No. 28)

20

Se prepararon dos polímeros de la presente invención, poli(PEG₅₀₀-MA)_n (compuesto No 27) y poli(PEG₅₀₀-MA)_n (compuesto No 28), de la manera siguiente. El material de partida para el primero es poli(PEG₅₀₀-MA) (AM-0510K, fabricado usando un procedimiento similar al descrito en la

5 patente japonesa No 2621308 y las publicaciones de solicitud de patente japonesa Nos 2003-105040 y 2003-104003), un copolímero de diéter alilmetílico de polioxietileno ($m = 6-16$, Alk = etileno, $R^1 = \text{hidrógeno}$ y $R^2 = \text{metilo}$) y anhídrido maleico, en donde la cadena lateral de polioxietileno tiene un peso molecular promedio de aproximadamente 500, y el grado de

10 polimerización promedio de la cadena principal está en la escala de 20 a 30, la relación de unidades de diéter alilmetílico de polioxietileno unidades de anhídrido maleico siendo de 1/2, y el peso molecular promedio siendo de aproximadamente 6,000 [el peso molecular promedio en número es de alrededor de 6,000, y el índice de distribución de peso molecular (M_w/M_n) es

15 de aproximadamente 1/25]. El material de partida para el último es poli(PEG₅₀₀-MA) (AM-0515K, fabricado usando un procedimiento similar al descrito en la patente japonesa No 2621308 y las publicaciones de solicitud de patente japonesa Nos 2003-105040 y 2003-104003), un copolímero de diéter alilmetílico de polioxietileno ($m = 6-16$, Alk = etileno, $R^1 = \text{hidrógeno}$ y R^2

20 = metilo) y anhídrido maleico, en donde la cadena lateral de polioxietileno tiene un peso molecular promedio de aproximadamente 500, el grado de polimerización promedio de la cadena principal es de alrededor de 15, y el peso molecular promedio es de aproximadamente 10,000. Los materiales de

partida se sometieron a amonólisis usando condiciones esencialmente idénticas a las usadas en el ejemplo 10, para dar los compuestos del título, sal sódica de poli(PEG₅₀₀-MA)_n (compuesto No 27) y sal sódica de poli(PEG₅₀₀-MA)_n (compuesto No 28) El contenido de grupos carboxilo para el polímero del título se determinó como se describe en el ejemplo de prueba 1 más adelante, y se encontró que es de 2.73 mmoles/g para el compuesto No 27, y de 2.05 mmoles/g para el compuesto No 28

EJEMPLO 19

10 Preparación de complejos de los modificadores poliméricos del ejemplo 18 con OCIF

Se prepararon complejos de polímero-OCIF de la presente invención como soluciones acuosas, usando esencialmente el mismo procedimiento preparativo como en el ejemplo 14 anterior, usando soluciones acuosas de los compuestos Nos 27 y 28 preparadas en el ejemplo 18 anterior como materiales de partida. Más específicamente, para cada uno de los modificadores, se mezcló una solución de 5 mg/ml de los mismos en PBS (pH 7.4) con una solución de 5 mg/ml de OCIF maduro de humano en PBS (pH 6.0), a una relación en volumen de 1:1. El pH de la mezcla resultante se ajustó a 5.5 con ácido clorhídrico a 1M, y entonces la mezcla de reacción se dejó reposando a 25°C durante 7 días. El tamaño molecular de los complejos resultantes se midió como se explica en el ejemplo de prueba 11 más

adelante

EJEMPLO 20

Evaluación de la composición de poli(PEG₅₀₀-MA) y preparación y
5 evaluación de poli(PEG₅₀₀-MA) a (compuestos Nos 29-53) bajo varias
condiciones

20 (1) Determinación de la relación de la composición de
poli(PEG₅₀₀-MA)

10 Se pusieron a prueba muchos copolímeros de diéter alilmetílico de polioxietileno y anhídrido maleico, poli(PEG₅₀₀-MA) de diferente composición, para determinar la relación de diéter alilmetílico de PEG y unidades de anhídrido maleico (la relación de la composición) en la misma (diferentes lotes de AM-0510K, fabricado usando un procedimiento similar al

15 descrito en la patente japonesa No 2623308 y las publicaciones de solicitud de patente japonesa Nos 2003-105040 y 2003-104003), un copolímero aleatorio de diéter alilmetílico de polioxietileno ($m = 6-16$, Alk = etileno, $R^1 =$ hidrógeno y $R^2 =$ metilo) y anhídrido maleico, en donde la cadena lateral de polioxietileno tiene un peso molecular promedio de aproximadamente 500, y el

20 grado de polimerización promedio de la cadena principal está en la escala de 20 a 30. Se muestra a continuación el peso molecular promedio en número (M_n) y el índice de distribución de peso molecular (M_w/M_n , en donde M_w es el peso molecular promedio en peso), de cada lote de los copolímeros puestos a

prueba El peso molecular (MW) de cada lote de poli(PEG₅₀₀-MA) se determinó mediante cromatografía de filtración en gel usando poli(etilenglicol) con un peso molecular predeterminado como patrón En consecuencia, el peso molecular de poli(PEG₅₀₀-MA) mostrado a continuación no es el peso molecular absoluto, sino el peso molecular relativo medido usando PEG como patrón

M3O538 $M_n = 6431$, $M_w / M_n = 1.27$

M3N549 $M_n = 6360$, $M_w / M_n = 1.23$

M3N550 $M_n = 5891$, $M_w / M_n = 1.28$

10 M3N569 $M_n = 5897$, $M_w / M_n = 1.25$

Para determinar la relación de la composición de cada uno de los copolímeros, fue necesario convertirlos a las sales de sodio correspondientes de los copolímeros hidrolizados, es decir, sal sódica de poli(PEG₅₀₀-MA)_n Las condiciones de hidrólisis usadas son las siguientes

15 Se añadieron 25 ml de 1,4-dioxano, 100 ml de éter y 42 ml de solución acuosa de NaOH a 1 N, a 1 g de poli(PEG₅₀₀-MA) (lote M3O538) La mezcla resultante se agitó entonces vigorosamente y, después de dejar que se asentara, se recogió la capa acuosa obtenida de esta manera La capa acuosa obtenida de esta manera se agitó a 40°C durante 2 horas después de
20 filtrar a través de papel filtro (704 x 40 m/m, obtenido de Nihon Rikagaku-kiki Corporation) Al concluir este tiempo, la solución resultante se secó por congelación La sal sódica del producto hidrolizado del material de partida, a saber, sal sódica de poli(PEG₅₀₀-MA)_n (lote M3O538), se obtuvo como un

sólido de color amarillo (100% de rendimiento)

Se añadieron 12 ml de 1,4-dioxano y 9 ml de solución acuosa de NaOH a 1 N, a 1 g de poli(PEG₅₀₀-MA) (lote M3N549) La mezcla resultante se agitó entonces a temperatura ambiente durante 24 horas Al término de este período, se añadió 1 ml de solución acuosa de NaOH a 1 N, y la mezcla resultante se deshidrató por congelación La sal sódica del producto hidrolizado del material de partida, a saber, sal sódica de poli(PEG₅₀₀-MA)h (M3N549), se obtuvo como un sólido de color amarillo (100% de rendimiento)

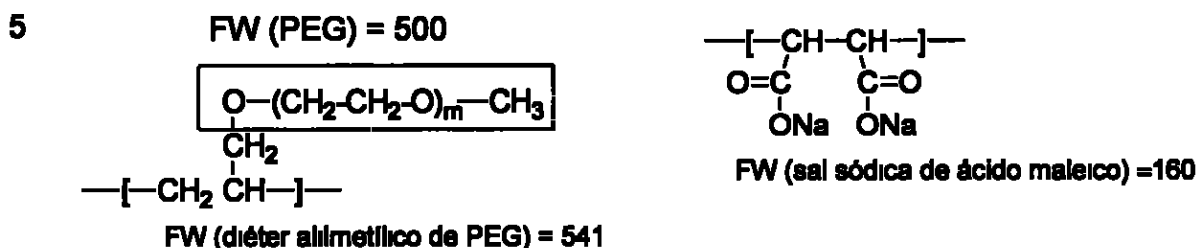
Se añadieron 5 ml de 1,4-dioxano y 9 ml de solución acuosa de NaOH a 1 N, a 2 g de poli(PEG₅₀₀-MA) (lote M3N550) La mezcla resultante se agitó entonces a 40°C durante 23 horas Al término de este período, la mezcla de reacción se deshidrató por congelación La sal sódica del producto hidrolizado del material de partida, a saber, sal sódica de poli(PEG₅₀₀-MA)h (lote M3N550), se obtuvo como un sólido de color amarillo (100% de rendimiento)

Se añadieron 5 ml de 1,4-dioxano y 9 ml de solución acuosa de NaOH a 1 N, a 2 g de poli(PEG₅₀₀-MA) (lote M3N569) La mezcla resultante se agitó entonces a 40°C durante 23 horas Al término de este período, la mezcla de reacción se deshidrató por congelación La sal sódica del producto hidrolizado del material de partida, a saber, poli(PEG₅₀₀-MA)h, se obtuvo como un sólido de color amarillo (100% de rendimiento)

El contenido de grupos carboxilo de cada una de las sales sódicas de poli(PEG₅₀₀-MA)h preparadas de esta manera, se midió mediante

titulación conductimétrica como se describió anteriormente. Los resultados se muestran en el cuadro 3 más adelante.

La sal sódica de poli(PEG₅₀₀-MA)_h comprende las dos siguientes unidades monoméricas:



Si el número de unidades monoméricas de sal sódica de ácido maleico por 1 unidad de diéter alilmetílico de PEG se define como "a", y la unidad de repetición mínima teórica comprende una unidad de diéter alilmetílico de PEG y "a" unidades de maleato de sodio, entonces el peso de la fórmula (FW) de la unidad de repetición mínima, está dada por la ecuación 1

FW [(diéter alilmetílico de PEG)₁ + (sal sódica de ácido maleico)_a] = FW (diéter alilmetílico de PEG) + a [FW (sal sódica de ácido maleico)] = 541 + 160a

(ecuación 1)

El número de grupos carboxilo en la unidad de repetición mínima de la sal sódica de poli(PEG₅₀₀-MA)_h, es 2a. En consecuencia, el contenido de grupos carboxilo (C, mmoles/g) en la unidad de repetición mínima de sal sódica de poli(PEG₅₀₀-MA)_h, está dado por la ecuación 2

$$C = 2a / (541 + 160a) * 1000 \quad \text{(ecuación 2)}$$

La relación del número de unidades de sal sódica de ácido maleico al número de unidades de diéter alilmetílico de PEG en las sales

sódicas de poli(PEG₅₀₀-MA)_h reales, es igual a la relación en las unidades de repetición mínima. En consecuencia, el valor de C es también el mismo en la unidad de repetición mínima y en las sales sódicas de poli(PEG₅₀₀-MA)_h reales, cuyo contenido de grupos carboxilo se determinó mediante titulación conductimétrica (véase anteriormente). De esta manera, midiendo el contenido de grupos carboxilo y usando la ecuación 2, puede obtenerse el valor de la relación de la composición "a", a saber, el número de unidades de sal sódica de ácido maleico por una unidad de diéter alilmetílico de PEG [que es la composición monomérica de poli(PEG₅₀₀-MA)]. Los resultados se muestran en el cuadro 3 siguiente.

CUADRO 3

		Lote de (PEG-500-MA)	Cantidad de grupos carboxilo (mmoles/g)	MA/diéter alilmetílico de PEG
15	Sal sódica de (PEG-500-MA) _h	#1 M 30538	4.66	2.01
		#2 M 3N549	5.21	2.42
		#3 M 3N550	5.98	3.10
		#4 M 3N569	6.14	3.26

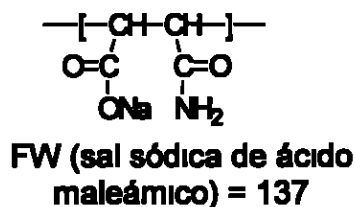
La relación de la composición de las sales sódicas de poli(PEG₅₀₀-MA)_h estuvo en la escala de 1.2 a 1.33. Obviamente, la relación de la composición es igual en poli(PEG₅₀₀-MA) y la sal sódica de poli(PEG₅₀₀-MA)_h, de modo que se confirmó que las relaciones de la composición monomérica de los diferentes copolímeros de partida de poli(PEG₅₀₀-MA)

estuvieron en la escala de 1 2 a 1 3 3

20(2) Amoniólisis de poli(PEG₅₀₀-MA) bajo diferentes condiciones para dar poli(PEG₅₀₀-MA)_a (compuestos Nos 29-53), y determinación de las relaciones de hidrólisis en dichos compuestos

Mediante el uso de la relación de la composición (a) y el contenido de grupos carboxilo de las sales sódicas de poli(PEG₅₀₀-MA)_h, puede calcularse de la manera siguiente la relación de hidrólisis (es decir, la relación de unidades de anhídrido de ácido maleico en el polímero de partida sometido a amoniólisis las unidades de anhídrido de ácido maleico sometidas a hidrólisis) La fórmula de la sal sódica de la unidad de ácido maleico amidado (sal sódica de ácido maleámico), se muestra a continuación

15



De la misma forma como en el caso de las sales sódicas de poli(PEG₅₀₀-MA)_h anteriores, puede suponerse que la unidad mínima de sal sódica de poli(PEG₅₀₀-MA)_a comprende una unidad de diéter alilmetílico de PEG, ax unidades de sal sódica de ácido maleámico y a(1-x) unidades de sal sódica de ácido maleico El peso de la unidad mínima de sal sódica de poli(PEG₅₀₀-MA)_a en la fórmula, está dado por la ecuación 3 siguiente

$$\text{FW [(éter alilmetílico de PEG)_1 + (sal sódica de ácido maleámico)_{ax} +$$

$$\begin{aligned}
 (\text{sal sódica de ácido maleico})_{a(1-x)} &= \text{FW (diéter alilmetílico de PEG)} + ax [\text{FW} \\
 &(\text{sal sódica de ácido maleámico})] + a(1-x) [\text{FW (sal de ácido maleico)}] \\
 &= 541 + 137ax + 160a(1-x) \\
 &= 541 + 160a - 23ax \quad (\text{ecuación 3})
 \end{aligned}$$

5 Puesto que el contenido de grupos carboxilo en la unidad mínima de sal sódica de poli(PEG₅₀₀-MA)_a es $ax + 2a(1-x) = 2a - ax$, el contenido de grupos carboxilo (C, mmoles/g) en la unidad mínima de sal sódica de poli(PEG₅₀₀-MA)_a, puede denvarse de la ecuación 4

$$C = 1000 \times (2a - ax) / (541 + 160a - 23ax) \quad (\text{ecuación 4})$$

10 La relación de hidrólisis (1-x) x puede determinarse de esta manera a partir de la ecuación 4, usando el contenido de grupos carboxilo (C, mmoles/g) que puede obtenerse por titulación conductimétrica de sal sódica de poli(PEG₅₀₀-MA)_a, y el valor de "a" que se obtuvo anteriormente

15 Varos ejemplos de la preparación de poli(PEG₅₀₀-MA)_a, y la relación de hidrólisis calculada en el producto, poli(PEG₅₀₀-MA)_a, se muestran a continuación

(a) Se añadió una solución de amoníaco a 0.5 M/1,4-dioxano (cantidades dadas en el cuadro 4 más adelante) a 100 mg de poli(PEG₅₀₀-MA), y la solución obtenida se agitó a las temperaturas y tiempos dados en el cuadro 4 más adelante. Al término del tiempo de reacción, se añadieron aproximadamente 0.4 ml (variando de 0.3 a 0.5 ml) de solución acuosa de NaOH a 1N a la mezcla de reacción. La solución resultante se deshidrató por congelación para obtener la sal sódica de poli(PEG₅₀₀-MA)_a como un material

222

sólido

La "velocidad de reacción del componente de amina" de cada una de las sales sódicas de poli(PEG₅₀₀-MA)a [es decir, el porcentaje de unidades de anhídrido de ácido maleico en el polímero de partida sometido a 5 amonólisis (100*x)] preparada bajo estas diferentes condiciones de reacción, se muestra en el cuadro 4 siguiente

CUADRO 4

10			Lote de poli(PEG- MA)	NH3 a 0.5 M añadido	Reacción		Cantidad de grupos carboxilo (mmoles/g de polímero)	Velocidad de reacción del componente de amina (%)
					Temperatura	Tiempo		
15	Sal sódica de poli(PEG 500- MA)a	#8	M 3N549	38 mL/g	25°C	20 h	2.79	99.5
		#9	M 3N549	1.75 mL/g	25°C	20 h	2.87	96.4
		#10	M 3N549	6 mL/g	25°C	24 h	3.26	80.9
		#11	M 3N549	10 mL/g	25°C	24 h	3.01	90.9
		#12	M 3N549	15 mL/g	25°C	24 h	2.91	94.6
		#13	M 3N549	20 mL/g	25°C	24 h	3.11	86.9
		#14	M 3N549	11 mL/g	25°C	24 h	3.26	81.1
		#15	M 3N549	12 mL/g	25°C	24 h	3.02	90.3
		#16	M 3N549	13 mL/g	25°C	24 h	2.98	92.1
		#17	M 3N549	7 mL/g	25°C	24 h	3.94	53.8
		#18	M 3N549	8 mL/g	25°C	24 h	3.08	88.1
		#19	M 3N549	9 mL/g	25°C	24 h	3.29	80.0
		#25	M 3N549	9 mL/g	15°C	24 h	3.05	89.4
		#27	M 3N549	9 mL/g	25°C	24 h	3.40	75.6
		#28	M 3N549	9 mL/g	30°C	24 h	3.02	90.6
20	#29	M 3N549	9 mL/g	37°C	24 h	3.16	85.0	
	#30	M 3N549	9 mL/g	25°C	16 h	3.00	91.3	
	#31	M 3N549	9 mL/g	25°C	1 h	2.95	93.2	
	#32	M 3N549	9 mL/g	25°C	5 h	3.25	81.3	
	#33	M 3N549	9 mL/g	25°C	4 día	3.92	54.8	
	#34	M 3N549	9 mL/g	25°C	21 h	3.13	86.2	
	#35	M 3N549	9 mL/g	25°C	21 h	2.95	93.3	
	#36	M 3N549	9 mL/g	25°C	21 h	3.15	85.5	
	Sal de amonio	#41	M 3N549	Amoníaco gaseoso	Medio DMF*		3.43	92.7

*DMF N,N-dimetilformamida

Los números 8-19, 25 y 27-37 son los polímeros del título, poli(PEG₅₀₀-MA)_a (compuestos Nos 29-52) Cada uno de estos polímeros es aleatorio, y m = 6-16, R³ = NH₂, relación de la composición = 1 2 4, y grado de polimerización promedio = 20-30

Como se muestra en el cuadro 4, todos los productos de reacción, poli(PEG₅₀₀-MA)_a (compuestos Nos 29-52), tuvieron "velocidades de reacción del componente de amina" muy altas, indicando que se obtuvo casi 100% de conversión al grupo amino usando las varias condiciones de reacción descritas anteriormente

Varios otros ejemplos de métodos de preparación alternativos de poli(PEG₅₀₀-MA)_a, se describen a continuación

(b) Se disolvieron 0.44 g de poli(PEG₅₀₀-MA) en 9 ml de dimetilformamida. Se hizo burbujear entonces amoníaco gaseoso en la solución a -50°C. La cantidad final de amoníaco en la mezcla de reacción fue de 0.67 g. La mezcla de reacción obtenida de esta manera se selló en una ampolla de vidrio bajo una atmósfera de nitrógeno, y se agitó entonces a temperatura ambiente durante 24 horas. Al término de este período, el amoníaco gaseoso se evaporó bajo presión reducida después de que la ampolla de vidrio se abrió. La mezcla de reacción se añadió entonces gota a gota a 90 ml de éter dietílico. El precipitado obtenido de esta manera se recogió y se secó bajo presión reducida. Se obtuvieron 0.28 g de sal de amonio de poli(PEG₅₀₀-MA)_a (compuesto No 53) (refendo como número 41

en el cuadro 4 anterior), como un polvo de color amarillo. El polímero es aleatorio, y $m = 6-16$, $R^3 = \text{NH}_2$, relación de la composición = 1 3 10, y grado de polimerización promedio = 20-30.

(c) Se obtuvo sal de amonio de poli(PEG₅₀₀-MA)_a de la misma forma como en (b), usando tolueno en lugar de dimetilformamida.

(4) Se obtuvo sal de amonio de poli(PEG₅₀₀-MA)_a de la misma forma como en (b), usando 1,4-dioxano en lugar de dimetilformamida.

EJEMPLO 21

Preparación del producto de la reacción de alcoholisis entre etanol y poli(PEG₅₀₀-MA) [poli(PEG₅₀₀-MA)_{ea}-Na] (en donde $m = 6-16$, $R_3 = \text{OCH}_2\text{CH}_3$, relación de la composición = 1 3 aproximadamente, grado de polimerización promedio = 20-30, relación de hidrólisis = 3 1 6 9 aproximadamente (compuesto No 54))

15

Se usó como material de partida poli(PEG₅₀₀-MA) (AM-0510K, lote M3N550, fabricado usando un procedimiento similar al descrito en la patente japonesa No 2621308 y las publicaciones de solicitud de patente japonesa Nos 2003-105040 y 2003-104003), un copolímero de diéter alilmetílico de polioxietileno ($m = 6-16$, Alk = etileno, $R_1 = \text{hidrógeno}$ y $R_2 = \text{metilo}$) y anhídrido maleico, en donde la cadena lateral de polioxietileno tiene un peso molecular promedio de aproximadamente 500, el grado de polimerización promedio de la cadena principal está en la escala de 20 a 30,

20

la relación de unidades de diéter alilmetílico de polioxietileno unidades de anhídrido maleico es de alrededor de 1 3, el peso molecular promedio en número (Mn) es de 5891, y el índice de distribución de peso molecular (Mn/Mw) es de 1 28 (véase el ejemplo 20 anterior) Se añadió 1 ml de etanol a 5 100 mg de dicho compuesto de partida, y la mezcla de reacción resultante se dejó agitando durante 16 horas a 40°C Al término de este período, se añadieron 52 µl de una solución de hidróxido de sodio a 2 5 N en etanol La mezcla obtenida de esta manera se concentró a 35°C mediante evaporación, y se secó entonces bajo vacío para obtener sal sódica de poli(PEG₅₀₀-MA)ea 10 (compuesto No 54), como un material oleoso Se calculó la relación de hidrólisis usando el método descrito en los ejemplos 3 y 6 anteriores A saber, determinando el contenido de grupos carboxilo de la sal sódica de poli(PEG₅₀₀-MA)ea (compuesto No 54) y la sal sódica de poli(PEG₅₀₀-MA)h correspondiente, se calculó la relación de residuos de anhídrido maleico en el 15 compuesto del título sometido a alcoholólisis el número total de residuos de anhídrido maleico en el material de partida, y se determinó que es de 0 69 De esta manera, puede observarse que 69% de los residuos de anhídrido maleico en el material de partida fueron sometidos a alcoholólisis, y que el 31% restante de los residuos de anhídrido maleico fue sometido a hidrólisis

20

EJEMPLO 22

Preparación de complejos del modificador polimérico del ejemplo 21 c n

OCIF

Se prepararon complejos de polímero-OCIF de la presente invención como soluciones acuosas, usando esencialmente el mismo procedimiento preparativo como en el ejemplo 14 anterior, usando una solución acuosa del compuesto No 54 preparada en el ejemplo 21 anterior [concentración del compuesto No 54, 17.2 mg/ml, medio PBS, pH 7.4 (que es una solución que se obtiene mezclando una solución acuosa que contiene 10 mM de fosfato ácido disódico y 150 mM de cloruro de sodio con una solución acuosa que contiene 10 mM de fosfato diácido de sodio y 150 mM de cloruro de sodio a una relación adecuada, para dar un regulador de pH que tiene un pH de 7.4)], y una solución acuosa de OCIF maduro purificado de humano (OCIF preparado como se describe en los documentos WO 96/26217 y EP 816380) (concentración de OCIF, 4 mg/ml, medio, regulador de pH que contiene ión fosfato a 10 mM y NaCl a 150 mM, pH 6.0). Más específicamente, se añadieron 0.472 ml de una solución de 17.2 mg/ml del compuesto No 54, a 1.328 ml de dicha solución de 4 mg/ml de OCIF, para dar una solución que contiene 4.5 mg/ml del compuesto No 54 y 3 mg/ml de OCIF. La mezcla de reacción resultante se dejó reposando durante 3 días a 4, 10 ó 25°C, para obtener soluciones acuosas de los complejos deseados de la presente invención. El tamaño de los complejos se midió en el ejemplo de prueba 13 más adelante.

EJEMPLO 23

Preparación del producto de la reacción de alcoholisis entre etanol y
poli(PEG₅₀₀-MA) [poli(PEG₅₀₀-MA)ea] (en donde m = 6-16, R₁ = OCH₂CH₃,
relación de la composición = aproximadamente 1:3, grado de
polimerización promedio=20-30 (compuesto No. 55)

5

Se usó como material de partida poli(PEG₅₀₀-MA) (AM-0510K, lote M3N550 fabricado usando un procedimiento similar al descrito en la patente japonesa No. 2621308 y las publicaciones de solicitud de patente japonesa Nos. 2003-105040 y 2003-104003), un copolímero aleatorio de

10 diéter alilmetílico de polioxietileno (m = 6-16, Alk = etileno, R₁=hidrógeno y R₂=metilo) y anhídrido maleico, en donde la cadena lateral de polioxietileno tiene un peso molecular promedio de aproximadamente 500, el grado de polimerización promedio de la cadena principal está en la escala de 20 a 30, la relación de unidades de diéter alilmetílico de polioxietileno unidades de

15 anhídrido maleico es de aproximadamente 1:3, el peso molecular promedio en número (M_n) es de 5891, y el índice de distribución de peso molecular (M_w/M_n) es de 1.28 (véase el ejemplo 20 anterior). Se añadieron 0.5 ml de etanol absoluto a 50 mg de dicho compuesto de partida, y la mezcla de reacción resultante se dejó reposando a 37°C durante 24 horas. El compuesto

20 del título, poli(PEG₅₀₀-MA)ea (compuesto No. 55), se obtuvo como una solución etanólica [concentración de poli(PEG₅₀₀-MA)ea: 100 mg/ml]

EJEMPLO 24

Preparación de complejos del modificador polimérico del ejemplo 23 con
OCIF

Se prepararon complejos de polímero-OCIF de la presente
5 invención como soluciones acuosas, usando esencialmente el mismo
procedimiento preparativo como en el ejemplo 14 anterior, usando la solución
etanólica del compuesto No 55 preparada en el ejemplo 23 anterior, y una
solución acuosa de OCIF maduro purificado de humano (OCIF preparado
como se describe en los documentos WO 96/26217 y EP 816380)
10 (concentración de OCIF, 5 mg/ml, medio, regulador de pH que contiene ión
fosfato a 10 mM y NaCl a 150 mM, pH 6.0) Más específicamente, se
añadieron 37.5 µl de la solución etanólica del compuesto No 55 a 0.5 ml de
dicha solución de 5 mg/ml de OCIF, y la mezcla de reacción resultante se dejó
agitando durante 3 días a 25°C, para dar soluciones de los complejos
15 deseados de la presente invención. El tamaño de los complejos se midió en el
ejemplo de prueba 13 más adelante.

EJEMPLO COMPARATIVO 1

Preparación de copolímero de éter metilvinílico de
20 **monometoxipoli(etilenglicol)-ácido maleico (PEG-PMVMA)**

Se preparó el copolímero de injerto de éter metilvinílico de
monometoxipoli(etilenglicol)-ácido maleico (PEG-PMVMA), de acuerdo al

método descrito en el ejemplo 2 de la solicitud de patente japonesa (Kokai)

No Hei 11-302199

EJEMPLO COMPARATIVO 2

5 **Preparación de un complejo que comprende copolímero de éter metilvinílico de monometoxipolietilenglicol-ácido maleico (PEG-PMVMA) y proteína de OCIF**

Se preparó OCIF purificado de humano (OCIF preparado como se describe en los documentos WO 96/26217 y EP 816380) modificado con PEG-PMVA preparado como se describió en el ejemplo comparativo 1 anterior, como una solución [medio PBS (pH 6.0)] en esencialmente la misma forma como en el ejemplo 9. Más específicamente, se mezcló 1 ml de la solución de OCIF [concentración de OCIF de 2 mg/ml, medio, PBS (pH 6.0)] y 1 ml de solución de PEG-PMVA [concentración de PEG-PMVA de 2 ó 20 mg/ml, medio, PBS (pH 6.0)], y la mezcla se dejó reposando durante 24 horas a 25°C para dar el compuesto del título

EJEMPLO COMPARATIVO 3

20 **Preparación de un complejo que comprende un modificador polimérico y proteína de OCIF, usando poli(PEG₅₀₀-MA) como el modificador polimérico**

Se añadieron 22 μ l de una solución de sulfóxido de dimetilo que contenía poli(PEG₅₀₀-MA) [AM-0530K, fabricado por NOF Corporation (refendo en lo sucesivo como "poli(PEG₅₀₀-MA)"] (concentración de polímero 35 a 350 mg/ml), a 284 μ l de una solución acuosa de OCIF purificado de humano (OCIF preparado como se describe en los documentos WO 96/26217 y EP 816380) (concentración de proteína 35 mg/ml, medio solución acuosa de NaH₂PO₄ a 0.5 M, cuyo pH se ajustó a 7.6 con solución acuosa de NaOH a 5M), y la solución obtenida de esta manera (concentración de OCIF 3.2 mg/ml, concentración de poli(PEG₅₀₀-MA) 2.5 mg/ml o 6.3 mg/ml) se agitó a 25°C durante 40 horas. Al término de este período, la solución se diluyó con PBS (pH 7.0), para obtener una solución de OCIF modificado con el modificador polimérico que tenía una concentración de OCIF de 0.25 mg/ml. La solución preparada de esta manera se almacenó a 4°C.

15

EJEMPLO DE PRUEBA 1

Medición del contenido de grupos carboxilo de los polímeros de los ejemplos 10 a 13 mediante titulación conductimétrica

El contenido de grupos carboxilo de cada uno de los polímeros [poli(PEG₅₀₀-MA)_a (compuestos Nos 9 y 10), poli(PEG₅₀₀-MA)_{dma} (compuesto No 11) y poli(PEG₅₀₀-MA)_h (compuesto No 12)] preparados en los ejemplos 10 a 13, se determinó mediante el método de titulación conductométrica de la manera siguiente.

Primeramente, cada uno de los polímeros se purificó usando filtración en gel de la manera siguiente. Para cada polímero, se disolvieron 100 mg del polímero en 4 ml de solución de hidróxido de sodio a 0.001 N. La solución se dividió en cuatro lotes, y cada lote de 1 ml se aplicó a una columna de filtración en gel (PD-10, fabricada por Amersham-Pharmacia). Se desechó el primer ml de eluyente. Se aplicaron entonces 1.5 ml de solución de hidróxido de sodio a 0.001 N a cada columna, y otros 1.5 ml fueron eluidos de la columna, y se desecharon. Se aplicaron entonces 2.5 ml de solución de hidróxido de sodio a 0.001 N a cada columna, y otros 2.5 ml fueron eluidos de la columna, y es esta fracción que contenía al compuesto purificado. Las fracciones purificadas de las cuatro columnas se combinaron para dar una solución purificada de los compuestos del título. Se determinó que el rendimiento después del paso de purificación (determinado espectrofotométricamente midiendo la absorbancia de poli(PEG₅₀₀-MA)_h a 210 nm antes y después de la purificación) es de 80%, y se determinó que la concentración en la solución purificada es de 8 mg/ml.

Para cada una de las soluciones del polímero purificado, se obtuvo una alícuota (2.5 a 7.5 ml) para 50 ml con agua destilada, o solución de hidróxido de sodio acuoso a 0.001 M, y entonces se añadió una solución de hidróxido de sodio acuoso a 1 M a la solución resultante para ajustar el pH a 12. Se añadió entonces ácido clorhídrico a 0.1 M a la solución en incrementos de 0.1 ml, o continuamente a un régimen de 0.1 ml/minuto. En la primera solución, se midieron el pH y la conductividad después de cada

adición, y en la última se midieron cada 15 segundos El contenido de grupos carboxilo del polímero se calculó entonces a partir de la cantidad de ácido clorhídrico a 0.1 M añadido en la región de regulación de pH para conductividad (que corresponde a una escala de pH de aproximadamente 10 a 5.5) Los resultados se muestran en el cuadro 5 siguiente

CUADRO 5

Ejemplo numero	Tipo de polímero (y compuesto No)	Contenido de grupos carboxilo (mmoles/g de polímero)	Relación de amonólisis/ aminólisis (%)	Relación de hidrólisis
10	poli(PEG ₅₀₀ -MA)a (9)	2.10	69	3.169
11	Poli(PEG ₅₀₀ -MA)a (10)	1.83	86	1.486
12	Poli(PEG ₅₀₀ -MA)dma (11)	2.02	71	2.971
13	Poli(PEG ₅₀₀ -MA)h (12)	3.21	-	10.0

Para los polímeros de los ejemplos 10 a 12, se determinó para cada uno mediante cálculo la relación de residuos de anhídrido maleico en el material de partida sometido a amonólisis o aminólisis residuos de anhídrido maleico sometidos a hidrólisis, de la manera siguiente Como se mostró en el cuadro 5 anterior, el contenido de grupos carboxilo por 1 g de poli(PEG₅₀₀-MA)h (compuesto No 12) es de 3.21 mmoles A partir de estos valores, se determinó el peso de poli(PEG₅₀₀-MA) (es decir, el peso del copolímero antes de la hidrólisis) por gramo de grupo funcional, y el peso de poli(PEG₅₀₀-MA)(compuestos Nos 9 y 10) obtenido añadiendo amoníaco a poli(PEG₅₀₀-

MA) por gramo de grupo funcional. Específicamente, se obtuvo el peso de poli(PEG₅₀₀-MA) (es decir, el peso del copolímero antes de la hidrólisis) por mol de residuo de anhídrido maleico, restando el peso molecular de una molécula de agua (18 g) del peso del copolímero totalmente hidrolizado, dando un valor de 605 g. El peso de poli(PEG₅₀₀-MA)_a (compuestos Nos 9 y 10) por mol de grupos carboxilo se obtuvo añadiendo el peso molecular de una molécula de amoníaco (17 g) al peso de poli(PEG₅₀₀-MA), dando un valor de 622 g. A partir de este valor, se determinó mediante cálculo el contenido teórico de grupos carboxilo (1 g/622) por 1 g de poli(PEG₅₀₀-MA)_a (compuestos Nos 9 y 10), en donde todos los residuos de anhídrido maleico habían sido sometidos a amoníólisis (es decir, sin hidrólisis), y se encontró que es de 1.61 mmoles. De la misma forma, se determinó el peso de poli(PEG₅₀₀-MA)_{dma} (compuesto No 11) obtenido añadiendo dimetilamina a poli(PEG₅₀₀-MA) por mol de grupos carboxilo, añadiendo el peso molecular de una molécula de dimetilamina al peso de poli(PEG₅₀₀-MA), dando un valor de 650 g. A partir de este valor, se determinó mediante cálculo el contenido teórico de grupos carboxilo por 1 g de poli(PEG₅₀₀-MA)_{dma}, en donde todos los residuos de anhídrido maleico habían sido sometidos a aminólisis por dimetilamina, y se encontró que es de 1.54 mmoles.

Para cada uno de los polímeros de los ejemplos 10 a 12, se determinó la relación de hidrólisis (el porcentaje del material de partida sometido a hidrólisis en comparación con amoníólisis o aminólisis), y el índice de reacción de amoníólisis o aminólisis (%) a partir del contenido de grupos

carboxilo por 1 g de poli(PEG₅₀₀-MA)_h (compuesto No 11), en donde todos los residuos de anhídrido maleico habían sido sometidos a hidrólisis, el contenido teórico de grupos carboxilo por 1 g de poli(PEG₅₀₀-MA)_a (compuestos Nos 9 y 10), en donde todos los residuos de anhídrido maleico habían sido sometidos a amoniólisis, el contenido teórico de grupos carboxilo por 1 g de poli(PEG₅₀₀-MA)_{dma} (compuesto No 11), en donde todos los residuos de anhídrido maleico habían sido sometidos a aminólisis por dimetilamina, y el contenido medido real de grupos carboxilo por 1 g de cada uno para cada uno de los polímeros de los ejemplos 10 a 12 medidos mediante titulación conductimétrica anterior. Los resultados se muestran en el cuadro 5

EJEMPLO DE PRUEBA 2

Evaluación de la retención de complejos de OCIF-modificador en sangre, usando ratas

15

Cada una de las muestras preparadas como se describió en el ejemplo 9, ejemplo comparativo 2 y OCIF purificado no modificado de humano (OCIF preparado como se describe en los documentos WO 96/26217 y EP 816380), se diluyó adecuadamente con PBS (pH 6.0), de modo que la concentración de OCIF fuera de 0.25 mg/ml. Cada una de las muestras diluidas obtenidas de esta manera se administró a la cola de una ratona Wistar de cinco semanas (teniendo un peso corporal de aproximadamente 100 g, y la cual había sido privada de alimento durante 1 día) a través de una

20

vena, de modo que la dosis de OCIF fuera de 0.5 mg/kg (2 ml/kg en volumen)

Seis horas después de la administración, se tomaron 200 µl de sangre del corazón de la rata, y entonces se midió la concentración de OCIF en el suero sanguíneo mediante un método de ELISA, siendo las condiciones usadas

5 como se describe en el ejemplo de prueba 3 más adelante

La concentración de OCIF en el suero sanguíneo medida después de la administración de cada muestra, se muestra en el cuadro 6 siguiente

CUADRO 6

Concentración de OCIF en el suero sanguíneo después de la administración intravenosa de cada muestra de OCIF

5		Modificador (y compuesto No)	Modificador/ OCIF (relación en peso)	Concentración de OCIF en el suero sanguíneo 6 horas después de la administración (ng/ml)	Condiciones en el mezclado*
		OCIF no modificado	-	25 ± 19	-
		PEG-PMVMA	1	101 ± 26	-
			10	361 ± 33	-
10		Poli(PEG ₁₅₀₀ -MA)h (2)	10	502 ± 70	-
		Poli(PEG ₁₅₀₀ -MA)a (7)	10	1029 ± 30	-
		Poli(PEG ₁₅₀₀ -MA)dma (8)	1	2145 ± 721	-
		Poli(PEG ₅₀₀ -MA)h (1)	10	750 ± 80	-
			2 5	434 ± 92	-
		Poli(PEG ₅₀₀ -MA)a (3)	10	3416 ± 440	-
			10	2445 ± 195	37°C
			2 5	3428 ± 27	-
			2 5	484 ± 92	1 hora
15			1	3004 ± 158	-
			1	2275 ± 130	pH 7 4
			1	3786 ± 461	40 horas
			1	777 ± 153	4°C
			0 5	2951 ± 512	-
		poli(PEG ₅₀₀ -MA)dma (4)	1	1014 ± 331	-

Las condiciones básicas en el mezclado fueron concentración de OCIF de 1 mg/ml, pH 6 0, 16 horas y 25°C Sólo las condiciones diferentes de éstas condiciones, se dan en el cuadro 6

Se apreciará fácilmente a partir del cuadro 6 anterior, que cada

uno de los complejos de modificador polimérico y proteína de la presente invención, mejoró significativamente la retención de la proteína en la sangre cuando se comparó con la retención de la proteína cuando se administró solo. Puede verse también comparando el complejo de PEG-PMVMA y proteína de la técnica anterior (descrito en la patente japonesa abierta al público No Hei 11-302199 y preparado en el ejemplo comparativo 2 anterior), y los complejos de la presente invención que tienen la misma relación en peso entre el modificador y proteína (1 ó 10), que los complejos de modificador y proteína de la presente invención dieron retención considerablemente mejorada de la proteína en la sangre en comparación con el complejo de PEG-PMVMA y proteína de la técnica anterior.

EJEMPLO DE PRUEBA 3

Evaluación del índice de detección de OCIF mediante ELISA

15

Uno de los problemas encontrados con los modificadores de proteína de la técnica anterior, es que la unión de los modificadores a la proteína causa modificación de la estructura de la proteína y/o protección de la proteína, debido a la formación de complejos voluminosos. Para poner a prueba los complejos de OCIF-modificador de la presente invención, se determinó el índice de detección de cada uno de los complejos preparados como se describió en el ejemplo 8 y el ejemplo comparativo 2, con base en el OCIF purificado no modificado de humano (OCIF preparado como se describe

20

en los documentos WO 96/26217 y EP 816380) mediante ELISA. La ELISA se llevó a cabo de la manera siguiente:

Se disolvió anticuerpo monoclonal de OCIF anti-humano OI-19 (preparado de acuerdo al método descrito en el documento EP0974671) en una solución de carbonato ácido de sodio a 0.1 M (pH 9.6), para obtener una solución que tuviera una concentración de OI-19 de 10 µg/ml. Se colocaron 100 µl de la solución de OI-19 preparada de esta manera en cada cavidad de una inmunoplaaca de 96 cavidades (fabricada por Nunc), y se dejó que las placas reposaran a 4°C durante la noche. Al término de este período, se añadió Block Ace a 50% (adquirido de Snow Brand Milk Products Co., Ltd.) a cada cavidad para bloqueo, y entonces las placas se lavaron tres veces con PBS (regulador de pH de lavado) que contenía Tween 20 a 0.1%. Se disolvió OCIF purificado de humano (OCIF preparado como se describe en los documentos WO 96/26217 y EP 816380) en regulador de pH de reacción primario (es decir, solución de regulador de pH de ácido clorhídrico-tris a 0.2 M (pH 7.4) que contenía Block Ace a 40%, Tween 20 a 0.1% y 10 µg/ml de IgG de ratón), para preparar soluciones patrón con varias concentraciones de OCIF. Se añadieron a cada cavidad 100 µl de cada una de las soluciones preparadas de esta manera con varias concentraciones de OCIF, las placas se agitaron a temperatura ambiente durante 2 horas, y entonces cada cavidad se lavó seis veces con el regulador de pH de lavado. Se diluyó entonces POD-OI-4 (es decir, un anticuerpo marcado con peroxidasa y que reconoce a OCIF, preparado como se describe en el documento EP 0974671) 10,000 veces con

regulador de pH de reacción secundario (es decir, solución de regulador de pH de ácido clorhídrico-tris a 0.1 M (pH 7.4) que contenía Block Ace a 25%, Tween 20 a 0.1% y 10 µg/ml de IgG de ratón), se añadieron 100 µl de la solución resultante a cada cavidad, las placas se agitaron a temperatura ambiente durante 2 horas, y entonces cada cavidad se lavó seis veces. Una vez que se hizo esto, se añadieron 100 µl de una solución de sustrato (reactivo soluble en TMB, disponible de Scytek) a cada cavidad, y las placas se agitaron a temperatura ambiente durante 10 a 15 minutos. Después, se añadieron 100 µl de un reactivo interruptor de reacción (regulador de pH interruptor de TMB, disponible de Scytek) a cada cavidad, y las placas se agitaron suavemente. Al término de este período, se midió la absorbancia a una longitud de onda de 450 nm para cada cavidad, mediante un lector de microplaca (MEML 001, fabricado por Molecular Device Corporation). A partir de estos resultados, se obtuvo una curva de calibración de la concentración de OCIF contra la absorbancia. Habiendo obtenido esta curva de calibración, el procedimiento se repitió para cada uno de los complejos puestos a prueba de OCIF y modificador, se añadieron a cada cavidad 100 µl de cada una de las soluciones que contenían un complejo de prueba, se llevó a cabo la reacción con POD-OI-4 de la misma forma como se indicó anteriormente, y entonces se midió la absorbancia a una longitud de onda de 450 nm para cada cavidad, mediante un lector de microplaca. La comparación de las absorbancias obtenidas con la curva de calibración, permitió medir la concentración de OCIF detectable mediante ELISA en cada uno de los

complejos

Para cada una de las muestras, se calculó el índice de falla para detectar el OCIF mediante ELISA, y los resultados se muestran en el cuadro 7 más adelante. El índice de falla para detectar el OCIF mediante ELISA, se

5 define mediante la siguiente ecuación

$$\text{Índice} = [1 - (\text{concentración de OCIF medida mediante ELISA}) / (\text{concentración de OCIF medida mediante el método de Lowry})] \times 100$$

En la ecuación anterior, el método de Lowry para medir la concentración de OCIF en los complejos, se determina como se describe en la solicitud de patente japonesa No 2002-190407. Esto da una medida de la
10 concentración total de OCIF en los complejos. El índice de falla para detectar el OCIF mediante ELISA en los complejos, es una medida del cambio de conformación del OCIF causado por la combinación con el modificador. Un índice de falla reducido, es evidencia de que el OCIF en el complejo puede ser
15 unido fácilmente por anticuerpos anti-OCIF OI-19 y OI-4, mostrando de esta manera poca o ninguna modificación de la estructura del OCIF en el complejo.

CUADRO 7

Indice de falla para detectar la muestra de OCIF mediante ELISA

5	Modificador (y compuesto No)	Modificador/OCIF (relación en peso)	Indice de falla para detectar OCIF mediante ELISA (%) (sobre la base de OCIF no modificado)
	OCIF	-	-
	PEG-PMVMA	1	25
		10	39
	poli(PEG ₁₅₀₀ -MA)h (2)	10	13
10	poli(PEG ₁₅₀₀ -MA)a (7)	10	15
	poli(PEG ₁₅₀₀ -MA)dma (8)	10	0
	poli(PEG ₅₀₀ -MA)h (1)	10	17
	poli(PEG ₅₀₀ -MA)a (3)	10	0
		2 5	0
	Poli(PEG ₅₀₀ -MA)dma (4)	1	12

A partir de los resultados mostrados en el cuadro 7 anterior, se puede observar que, para los complejos de modificador polimérico y proteína de la presente invención, el Índice de falla para detectar el OCIF mediante ELISA como resultado de modificación de la estructura de la proteína, disminuyó significativamente en comparación con el alto índice que se obtuvo en el caso del complejo de PEG-PMVMA y proteína de la técnica anterior preparado en el ejemplo de prueba 2 anterior

A partir de los resultados de los ejemplos de prueba 2 y 3, se confirmó de esta manera que la disminución en la sensibilidad de la detección de la proteína, causada por la modificación excesiva de la proteína para los complejos de modificador polimérico y proteína de la presente invención, es muy reducida y, además, la retención de la proteína en dichos complejos en

sangre es significativamente mejor que la lograda con los complejos de la técnica anterior

EJEMPLO DE PRUEBA 4

5 Medición de la concentración de OCIF en sangre

Cada una de las muestras preparadas como se describió en el ejemplo 9, y OCIF purificado de humano (OCIF preparado como se describe en los documentos WO 96/26217 y EP 816380), se diluye adecuadamente
10 con PBS (teniendo un pH de 6.0 a 7.4), de modo que la concentración de OCIF sea de 0.1 a 1 mg/ml. Cada una de las muestras diluidas preparadas de esta manera se administró entonces a un mono *Cynomolgus* hembra de seis o siete años (teniendo un peso corporal de 2 a 4 kg, y que había sido privado de alimento durante un día) a través de la vena safena, o vía subcutánea
15 dorsalmente para administrar una dosis de OCIF de 0.1 a 1 mg/kg (1 ml/kg en volumen). A un período predeterminado en la escala de cinco minutos a un mes después de la administración, se toman 500 µl de sangre del vaso sanguíneo femoral del mismo, y se midió la concentración de OCIF en el suero sanguíneo mediante el método de ELISA descrito en el ejemplo de
20 prueba 3 anterior.

EJEMPLO DE PRUEBA 5

Medición de la densidad ósea

Cada una de las muestras preparadas como se describió en el ejemplo 9, y OCIF purificado de humano (OCIF preparado como se describe en los documentos WO 96/26217 y EP 816380), se diluye adecuadamente con PBS (teniendo un pH de 6.0 a 7.4), de modo que la concentración de OCIF esté en la escala de 0.7 a 3.5 mg/ml. Se prepara entonces un adyuvante usando células destruidas de *Mycobacterium butyricum* y parafina líquida, y se inyecta en la piel de la raíz de la cola de una rata Lewis hembra de 5 a 10 semanas, para provocar artritis en dicha rata. Dos semanas después de la inyección del adyuvante, cada una de las muestras preparadas se administra a la rata mediante la vena de la cola, o vía subcutánea dorsalmente, de modo que la dosis de OCIF sea de 1.4 a 7 mg/kg (2 ml/kg en volumen). Tres semanas después de la inyección del adyuvante, se diseca la rata para extraer el fémur derecho e izquierdo, y se mide la densidad ósea del mismo.

EJEMPLO DE PRUEBA 6

Evaluación del tamaño molecular mediante electroforesis en gel de SDS-poliacrilamida bajo condiciones no reductoras

20

Se evaluó el tamaño molecular de cada uno de los complejos de modificador polimérico y OCIF preparados como se describe en el ejemplo 14 y ejemplo comparativo 3, y OCIF purificado de humano (OCIF preparado

como se describe en los documentos WO 96/26217 y EP 816380) mediante SDS-PAGE bajo condiciones no reductoras, de la manera siguiente

Se añadieron 5 μ l de regulador de pH de muestra de LDS NuPAGE (marca registrada) (4X) (obtenido de Invitrogen Life Technologies) y 5 μ l de agua purificada, a 10 μ l de cada una de las muestras puestas a prueba [que se diluyeron, si era necesario, con solución salina regulada en su pH con fosfato (PBS) (pH 7.0), que es una solución de regulador de pH que se obtiene mezclando una solución que contiene fosfato ácido disódico a 10 mM y cloruro de sodio a 150 mM, y una solución que contiene fosfato diácido de sodio a 10 mM y cloruro de sodio a 150 mM a una relación en volumen adecuada, para dar un regulador de pH 7.0), de modo que la concentración de proteína fuera de 250 μ g/ml], y cada una de las soluciones resultante se calentó a 95°C durante 7 minutos. Al término de este período, la cantidad total de la mezcla de reacción se añadió a un gel de electroforesis de SDS-poliacrilamida (gel de acetato-tris de 3 a 8% que tiene un espesor de 1 mm, y fabricado por NOVEX), y se aplicó un voltaje de 150 V al gel, usando un dispositivo de suministro de energía (PhoreStar Pro, fabricado por Anatech). Después de concluir la electroforesis, la proteína sobre el gel se tiñó con azul de Coomassie de acuerdo a un método bien conocido por los expertos en la técnica.

Como puede observarse en las figuras 1 y 2, el OCIF modificado con el modificador polimérico de la presente invención fue detectable establemente con una sustancia que tenía un peso molecular mayor que el del

OCIF no modificado (120 kD) a todas las relaciones de mezclado (se detectó una banda primaria de 130 a 150 kD y una banda secundaria de 180 a 200 kD con base en los marcadores de peso molecular), y además no se detectó complejo alguno que tuviera un peso molecular mayor de 210 kD. Se obtuvieron también resultados similares (no mostrados) para los otros modificadores poliméricos de la presente invención, que fueron los productos de aminólisis y alcoholólisis. Por otra parte, como puede observarse en la figura 3, en el caso de OCIF modificado con el modificador polimérico convencional poli(PEG₅₀₀-MA) preparado en el ejemplo comparativo 3, la cantidad de complejo voluminoso obtenido aumenta notablemente conforme aumenta la relación del modificador.

Este resultado muestra que mediante el uso del modificador polimérico de la presente invención, es posible suprimir notablemente la formación de complejos voluminosos que no son farmacéuticamente preferibles, y preparar un complejo de modificador polimérico y proteína que tiene propiedades estables sin importar la relación de mezclado, cuando se compara con el modificador polimérico poli(PEG₅₀₀-MA) estructuralmente bastante similar de la técnica anterior.

20

EJEMPLO DE PRUEBA 7

Evaluación de la actividad de formación de enlaces covalentes de

poli(PEG₅₀₀-MA)a

Se determinó la reactividad de cada uno de los modificadores
poliméricos poli(PEG₅₀₀-MA)_a (compuesto No 9) y poli(PEG₅₀₀-MA)_h
(compuesto No 12) a tetrametilrodamina cadavenna, que es una sustancia
fluorescente que tiene un grupo amino y un peso molecular de 514 62
5 (disponible de Molecular Probes, Inc) (referida en lo sucesivo como "Rho-
NH₂"), y se evaluó la actividad de formación de enlaces covalentes de los
modificadores, comparando la reactividad de los dos modificadores
poliméricos de la manera siguiente

Se añadieron 3 8 µl de soluciones de cada uno de poli(PEG₅₀₀-
10 MA)_h (compuesto No 12) (preparado como se describió en el ejemplo 13
anterior) y poli(PEG₅₀₀-MA)_a (compuesto No 9) [concentración de polímero
21 mg/ml, medio PBS (se ajustó el pH con NaOH a 1M a 9 5)] (preparado
como se describió en el ejemplo 10 anterior), a 18 9 µl de PBS (pH 6 0) que
contenía 1 08 mg/ml de Rho-NH₂. Las soluciones obtenidas de esta manera
15 se dejaron reposando a 25°C durante tres días. Al término de este período, las
mezclas de reacción fueron fraccionadas mediante cromatografía de filtración
en gel (columna PD-10 fabricada por Amersham Biotech, fase móvil agua
purificada), de la manera siguiente: se aplicaron 0 5 ml de la mezcla de
reacción a la columna de filtración en gel, y se escumieron 0 5 ml de la
20 columna y se desecharon. Se añadieron 2 ml de agua destilada a la columna,
y otros 2 ml fueron eluidos, y se desecharon. Se añadieron otros 2 ml de agua
destilada a la columna, y otros 2 ml fueron eluidos, y ésta fracción contenía a
la fracción del polímero. Se cuantificó la Rho-NH₂ contenida en las fracciones

del polímero, mediante espectrometría de fluorescencia (longitud de onda de
excitación 544 nm, longitud de onda fluorescente 571 nm, medio agua
purificada ajustada a pH 3), para calcular la relación de la cantidad de Rho-
NH₂ contenida en cada complejo del polímero y Rho-NH₂ con respecto a la
5 cantidad total de Rho-NH₂ en la mezcla de reacción, es decir, la relación de
unión de Rho-NH₂ al polímero

Los resultados se muestran en el cuadro 8 siguiente

CUADRO 8

10

Reactividad del modificador polimérico

	Relación de unión de Rho-NH ₂ al polímero* (%)
Rho-NH ₂ + poli(PEG ₅₀₀ -MA)a	11 5, 12 6
Rho-NH ₂ + poli(PEG ₅₀₀ -MA)h	0 8, 1 6
Rho-NH ₂ sola	0, 0

15

* Esta prueba se llevó a cabo dos veces

Puede verse fácilmente a partir del cuadro 8 anterior, que para la
mezcla de reacción del modificador polimérico poli(PEG₅₀₀-MA)a (compuesto
No 9) con Rho-NH₂, existe un nivel bastante alto de Rho-NH₂ detectado en la
20 fracción del polímero Esto contrasta con la mezcla de reacción del
modificador polimérico poli(PEG₅₀₀-MA)h (compuesto No 12) con Rho-NH₂,
en donde sólo existe un bajo nivel de Rho-NH₂ detectado en la fracción del
polímero Cuando se aplicó Rho-NH₂ sola a la columna, ninguna Rho-NH₂ fue
eluida en la "fracción del polímero" Estos resultados indican que el

modificador polimérico poli(PEG₅₀₀-MA)_a (compuesto No 9) de la presente invención, se une fuertemente al grupo amino de la Rho-NH₂. Por otra parte, la relación de unión del modificador polimérico poli(PEG₅₀₀-MA)_h (compuesto No 12) de la presente invención es reducida, sugiriendo que este modificador

5 polimérico no se une fuertemente al grupo amino de la Rho-NH₂

EJEMPLO DE PRUEBA 8

Evaluación del índice de detección de OCIF mediante ELISA

10 Se determinó el índice de detección de cada uno de los complejos de OCIF y modificador polimérico preparados como se describió en el ejemplo 14 y el ejemplo comparativo 3 anteriores, con base en el OCIF purificado no modificado de humano (OCIF preparado como se describe en los documentos WO 96/26217 y EP 816380) mediante ELISA. La ELISA se

15 llevó a cabo de la manera siguiente

Se disolvió anticuerpo monoclonal de OCIF anti-humano OI-19 (preparado de acuerdo al método descrito en el documento EP0974671) en una solución de carbonato ácido de sodio a 0.1 M (pH 9.6), para obtener una solución que tuviera una concentración de OI-19 de 10 µg/ml. Se colocaron

20 100 µl de la solución de OI-19 preparada de esta manera en cada cavidad de una inmunoplaqueta de 96 cavidades (fabricada por Nunc), y se dejó que las placas reposaran a 4°C durante la noche. Al término de este período, se añadió Block Ace a 50% (adquirido de Snow Brand Milk Products Co., Ltd.) a

cada cavidad para bloqueo, y entonces las placas se lavaron tres veces con PBS (regulador de pH de lavado) que contenía Tween 20 a 0.1%. Se disolvió OCIF purificado de humano (OCIF preparado como se describe en los documentos WO 96/26217 y EP 816380) en regulador de pH de reacción humano (es decir, solución de regulador de pH de ácido clorhídrico-tris a 0.2 M (pH 7.4) que contenía Block Ace a 40%, Tween 20 a 0.1% y 10 µg/ml de IgG de ratón), para preparar soluciones patrón con vanas concentraciones de OCIF. Se añadieron a cada cavidad 100 µl de cada una de las soluciones preparadas de esta manera con vanas concentraciones de OCIF, las placas se agitaron a temperatura ambiente durante 2 horas, y entonces cada cavidad se lavó seis veces con el regulador de pH de lavado. Se diluyó entonces POD-
OI-4 (es decir, un anticuerpo marcado con peroxidasa y que reconoce a OCIF, preparado como se describe en el documento EP 0974671) 10,000 veces con regulador de pH de reacción secundario (es decir, solución de regulador de pH de ácido clorhídrico-tris a 0.1 M (pH 7.4) que contenía Block Ace a 25%, Tween 20 a 0.1% y 10 µg/ml de IgG de ratón), se añadieron 100 µl de la solución resultante a cada cavidad, las placas se agitaron a temperatura ambiente durante 2 horas, y entonces cada cavidad se lavó seis veces. Una vez que se hizo esto, se añadieron 100 µl de una solución de sustrato (reactivo soluble en TMB, disponible de Scytek) a cada cavidad, y las placas se agitaron a temperatura ambiente durante 10 a 15 minutos. Después, se añadieron 100 µl de un reactivo interruptor de reacción (regulador de pH interruptor de TMB, disponible de Scytek) a cada cavidad, y las placas se

230

agitaron suavemente Al término de este período, se midió la absorbancia a una longitud de onda de 450 nm para cada cavidad, mediante un lector de microplaca (MEML 001, fabricado por Molecular Device Corporation) Se calculó la concentración de OCIF de cada muestra patrón de OCIF con base en la curva de calibración producida usando soluciones de OCIF que tenían una concentración conocida

Para cada una de las muestras del complejo puesto a prueba, se midieron las absorbancias, se calcularon las concentraciones de OCIF a partir de la curva normal, y se calculó el índice de falla para detectar el OCIF mediante ELISA como se explicó en el ejemplo de prueba 3 anterior Los resultados obtenidos se muestran en el cuadro 9 siguiente

CUADRO 9

Índice de falla para detectar la muestra de OCIF mediante ELISA

15

20

Modificador (y compuesto No)	Modificador/OCIF (relación en peso)	Índice de falla para detectar OCIF mediante ELISA (%) (con base en el OCIF no modificado)
OCIF solo	-	-
poli(PEG ₅₀₀ -MA)h (12)	1	8
Sal sódica de poli(PEG ₅₀₀ -MA)a (9)	1	0
	0 75	0
	0 5	0
	0 25	0
poli(PEG ₅₀₀ -MA)	7 8	98
	1 9	89
	0 78	60

Puede verse fácilmente en el cuadro 9 anterior que, para cada uno de los complejos de modificador polimérico y proteína de la presente invención preparados en el ejemplo 14, el índice de falla para detectar el OCIF mediante ELISA causado por modificación de la proteína, disminuyó significativamente en comparación con el complejo de polímero y proteína de la técnica anterior preparado en el ejemplo comparativo 3, para el cual el índice de falla para detectar el OCIF mediante ELISA fue muy alto

A partir de estos resultados, es claro que los complejos de modificador polimérico y proteína de la presente invención, dan sólo una disminución muy pequeña en la sensibilidad de detección mediante ELISA que puede ser causada por el exceso de modificación de la proteína y/o por formación de un complejo voluminoso

15

EJEMPLO DE PRUEBA 9

Evaluación de la retención en sangre usando ratas

Cada una de las muestras preparadas en el ejemplo 14 y el OCIF purificado no modificado de humano (OCIF preparado como se describe en los documentos WO 96/26217 y EP 816380), fue diluida adecuadamente con PBS (pH 7.0), de modo que la concentración de OCIF fuera de 0.25 ó 0.025 mg/ml. Cada una de las muestras diluidas obtenidas de esta manera, se administró a una rata hembra Wistar de cinco semanas (teniendo un peso

20

corporal de aproximadamente 100 g que había sido privada de alimento durante un día) a través de una vena femoral, de modo que la dosis de OCIF fuera de 0.5 ó 0.05 mg/kg (2 ml/kg en volumen). Seis horas después de la administración, se tomaron 200 µl de sangre de la vena yugular de la rata, y entonces se midió la concentración de OCIF en suero sanguíneo mediante el método de ELISA descrito anteriormente.

La concentración de OCIF en suero sanguíneo medida después de la administración de cada muestra, se muestra en el cuadro 10 siguiente.

10

CUADRO 10
Concentración de OCIF en suero sanguíneo después de administración intravenosa de cada muestra de OCIF

15

Modificador (y compuesto No.)	Modificador/OCIF (relación en peso)	Dosificación (mg/kg)	Concentración de OCIF en suero sanguíneo 6 horas después de la administración (ng/ml)
OCIF solo	-	0.5	18
poli(PEG ₅₀₀ -MA)h (12)	1	0.05	127
Sal sódica de poli(PEG ₅₀₀ -MA)a (9)	1	0.05	603
	1	0.5	5,549
	0.75	0.5	4,770
	0.5	0.5	4,292
	0.25	0.5	3,020

20

Como es evidente en el cuadro 10 anterior, el complejo de modificador polimérico y proteína de la presente invención, mejoró significativamente la retención de dicha proteína en la sangre cuando se comparó con el caso cuando la proteína se administró sola

A partir de los resultados anteriores, es claro que el complejo de modificador polimérico y proteína de la presente invención puede producirse establemente bajo condiciones de amplia escala, y que dicho complejo mejora significativamente la retención de la proteína del complejo en sangre después de la administración. Por lo tanto, es probable que el complejo sea extremadamente útil en los campos farmacéutico y bioquímico

EJEMPLO DE PRUEBA 10

Evaluación de la retención en sangre usando ratas

15

Cada una de las muestras preparadas en los ejemplos 17 y 19, se evaluó de la misma forma como en el ejemplo de prueba 9. La concentración de OCIF en suero sanguíneo medida después de la administración de cada muestra, se muestra en el cuadro 11 siguiente

20

CUADRO 11

Concentración de OCIF en suero sanguíneo después de administración intravenosa de cada muestra de OCIF

5	Ejemplo número	Modificador (y compuesto No)	Fracclón	Modificador/ OCIF (relación en peso)	Dosificación (mg/kg)	Concentración de OCIF en suero
						sanguíneo después de 6 horas de la administración (ng/ml)
10	17	poli(PEG ₅₀₀ -MA) _n -Na				
		14	SRF55-60	1	0 05	437
		14		2 5	0 05	460
		15	SRF60-65	1	0 05	478
		19	SDF60-70	1	0 5	4 255
	17	poli(PEG ₁₆₀₀ -MA) _n				
		21	SRF55-60	1	0 5	256
		21		2 5	0 05	334
	19	poli(PEG ₅₀₀ -MA) _n				
		27	No fraccionado	1	0 5	6 138
		28	No fraccionado	1	0 5	6 713

Puede verse fácilmente en el cuadro 11 anterior, que todos los modificadores poliméricos puestos a prueba de la presente invención que tienen varios tamaños moleculares, aumentaron significativamente la retención de la proteína en sangre en comparación con el caso cuando la proteína se administró sola

EJEMPLO DE PRUEBA 11

Evaluación del tamaño molecular mediante cromatografía de exclusión por tamaño

Se evaluó el tamaño molecular de cada uno de los complejos del modificador polimérico y OCIF preparados en el ejemplo 9, ejemplo 14, ejemplo 17 y ejemplo 19, mediante cromatografía de exclusión por tamaño. Las condiciones de prueba se muestran en el cuadro 12 siguiente.

5

CUADRO 12**Condiciones para la cromatografía de exclusión por tamaño**

	Aparato de cromatografía Explorer 10S (Amersham Biotech)
10	Columna Superdex 200 HR10/30 (Amersham Biotech)
	Fase móvil solución salina regulada en su pH con fosfato (Na_2HPO_4 a 8 mM, KH_2PO_4 a 15 mM, NaCl a 145 mM, 0.5 g/L de NaN_3)
	Temperatura analítica 4°C
	Longitud de onda para la detección 280 nm
15	Velocidad de flujo de la fase móvil 0.6 mL/min
	El tiempo de retención de las siguientes proteínas patrón bajo las condiciones mencionadas anteriormente, se muestra en el cuadro 13 siguiente.

20

CUADR 13

Tiempo de retención de cada proteína patrón

	Tipo de proteína	Peso molecular (kD)	Radio de Stokes (nm)	Tiempo de retención (min)
5	Ferritina	440	6 10	18 41
	Aldosa	158	4 81	22 48
	Ovoalbumina	43	3 05	25 19
	Ribonucleasa	13 7	1 64	29 56

A partir de los resultados de la cromatografía de exclusión por
10 tamaño, se determinó que el radio de Stokes del OCIF no combinado es de
5 63 nm, y que el de cada complejo de modificador polimérico-OCIF de la
invención, es como se muestra a continuación

Complejos preparados en el ejemplo 9

15 Complejos de poli(PEG₅₀₀-MA)h (compuesto No 1)-OCIF (radios
de Stokes variando de 6 13 nm a 7 32 nm),

 Complejos de poli(PEG₅₀₀-MA)a (compuesto No 3)-OCIF (de
6 12 nm a 6 54 nm),

 Complejo de poli(PEG₅₀₀-MA)dma (compuesto No 4)-OCIF (6 39
20 nm),

 Complejo de poli(PEG₅₀₀-MA)ipa (compuesto No 5)-OCIF (6 26
nm),

 Complejo de poli(PEG₅₀₀-MA)ea (compuesto No 6)-OCIF (6 44

nm),

Complejo de poli(PEG₁₅₀₀-MA)_h (compuesto No 2)-OCIF (de 6 44 nm a 6 71 nm),

Complejo de poli(PEG₁₅₀₀-MA)_a (compuesto No 7)-OCIF (de 5 6 40 nm a 6 47 nm),

Complejo de poli(PEG₁₅₀₀-MA)_{dma} (compuesto No 8)-OCIF (6 55 nm)

A partir de estos resultados, es evidente que cada uno de los complejos de la invención tuvo un radio de Stokes que fue mayor por aproximadamente 1 nm que el del OCIF no combinado en solución salina regulada en su pH con fosfato usada como la fase móvil. Además, para cada una de las muestras, no se detectó un valor máximo derivado del OCIF no modificado, mostrando la estabilidad de los complejos.

Se determinaron los radios de Stokes de los otros complejos bajo condiciones similares a las descritas anteriormente. Los resultados son los siguientes:

Complejos preparados en el ejemplo 14

Se encontró que los complejos preparados bajo las condiciones de concentración de OCIF, 5 mg/ml, concentración del modificador polimérico variando de 1 25 mg/ml a 5 mg/ml, pH 7 4, 25 °C, 36 h, medio, solución salina regulada en su pH con fosfato (concentración de fosfato, 10 mM, concentración de NaCl, 150 mM), tenían radios de Stokes que variaban de 6 2

nm a 6 5 nm Además, para cada una de las muestras, no se detectó un valor máximo derivado del OCIF no modificado, mostrando la estabilidad de los complejos

5 Complejos preparados en el ejemplo 17

Se encontró que los complejos preparados con las condiciones de incubación de concentración de OCIF, 0 5 mg/ml, concentración de modificador polimérico, 0 5 mg/ml, pH 6 0, 25°C, 168 h, medio, solución salina regulada en su pH con fosfato (concentración de fosfato, 10 mM, 10 concentración de NaCl, 150 mM), tenían radios de Stokes que vanaban de 6 1 nm a 6 7 nm Además, para cada una de las muestras, no se detectó un valor máximo derivado del OCIF no modificado, mostrando la estabilidad de los complejos

15 Complejos preparados en el ejemplo 19

Se encontró que los complejos preparados con condiciones de incubación de concentración de OCIF, 5 mg/ml, concentración de modificador polimérico, 5 mg/ml, pH 5 5, 25°C, 168 h, medio, solución salina regulada en su pH con fosfato (concentración de fosfato, 10 mM, concentración de NaCl, 20 150 mM), tenían radios de Stokes que vanaban de 6 3 a 6 8 nm Además, para cada una de las muestras, no se detectó un valor máximo derivado del OCIF no modificado, mostrando la estabilidad de los complejos

El incremento en los radios de Stokes de los complejos de

modificador polimérico/OCIF de la presente invención cuando se compararon con el OCIF no combinado, puede atribuirse a la modificación del OCIF con los modificadores poliméricos de la presente invención

5

EJEMPLO DE PRUEBA 12

Evaluación de la retención en sangre usando ratas, y evaluación del

Índice de detección de OCIF mediante ELISA

Se puso a prueba la retención en sangre y el índice de detección de OCIF mediante ELISA para el complejo preparado en el ejemplo 22 (complejo del compuesto No 54 y OCIF) (temperatura de incubación 25°C), de la misma forma como se describió en los ejemplos de prueba 2 y 3 anteriores. La dosis equivalente de OCIF se ajustó a 0.1 mg/kg. Se encontró que la concentración de OCIF en suero es de 189 ng/ml 6 horas después de la inyección intravenosa del complejo. De esta forma, se confirmó que los complejos preparados con sal sódica de poli(PEG₅₀₀-MA)ea (compuesto No 54) en el ejemplo 22 anterior, mostraron un nivel de retención excelente en la sangre. Además, se encontró que la disminución en la sensibilidad de detección del OCIF mediante ELISA debido a la modificación excesiva de la proteína por el modificador en el complejo, es muy baja.

20

EJEMPLO DE PRUEBA 13

Evaluación del tamaño del complejo

Se evaluó el tamaño molecular de los complejos preparados en los ejemplos 22 (complejo del compuesto No 54 y OCIF) y 24 (complejo del compuesto No 55 y OCIF) mediante cromatografía de filtración en gel, como se describió en el ejemplo de prueba 11 anterior. Se encontró que el tamaño molecular de estos complejos mostró un alto nivel de uniformidad. Para los complejos del compuesto No 54 y OCIF combinados a 4°C, 10°C y 25°C, se encontró que los radios de Stokes son de 6.0 nm, 6.0 nm y 6.0 nm. Para los complejos del compuesto No 55 y OCIF, los radios de Stokes fueron de 6.4 nm. Cada uno de los complejos preparados en los ejemplos 22 y 24, tuvo de esta manera un radio de Stokes mayor que el OCIF purificado no modificado de humano (radio de Stokes 5.63 nm).

EJEMPLO DE PREPARACION

15

Se deshidrata por congelación una solución que contiene al complejo obtenido bajo condiciones estériles de la misma forma como se describió en el ejemplo 14 anterior, para obtener una preparación deshidratada por congelación.

LISTADO DE SECUENCIAS

<110> Sankyo Company, Limited

<120> Modificadores Poliméricos y Composiciones Farmacéuticas

5

<130> sankyoFP0408

<150> JP2003-80389

<151> 2003-03-24

<150> JP2003-355835

<151> 2003-10-16

<150> JP2003-426598

<151> 2003-12-24

10

<160> 1

<170> Patentin versión 3 1

<210> 1

<211> 401

<212> PRT

<213> Homo sapiens

15

<220>

<223> Inventor Kasuya Yuji

Inventor Hnoma Masahi

<220>

<221> SEÑAL

<222> (-21) (1)

<223>

<220>

<221> péptido mat

<222> (+1) (+380)

<223>

20

<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 1510

	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			
5	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	
10	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
15					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			
20	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
255 280 285

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

5 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

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

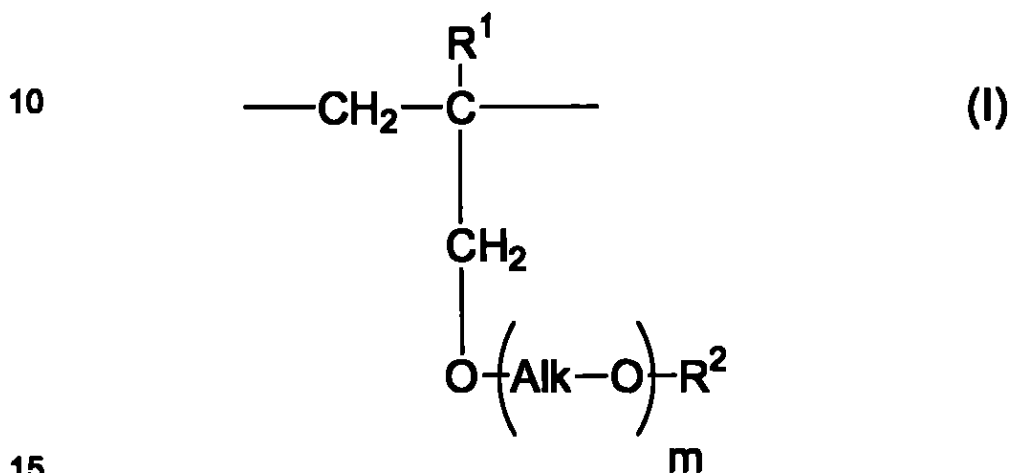
Ile Arg Phe Leu His Ser Phe Thr Met Tyr Lys Leu Tyr Gln Lys Leu
350 355 360

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

15 Leu
380

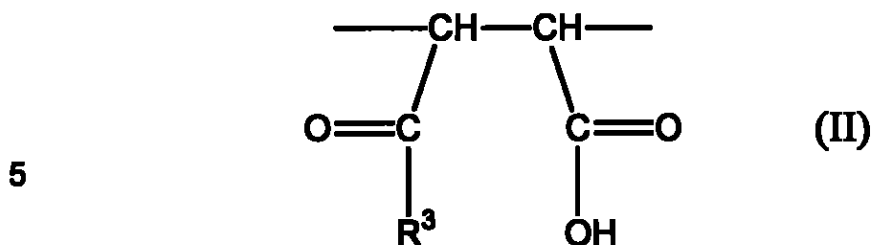
NOVEDAD DE LA INVENCION**REIVINDICACIONES**

- 5 1 - Un copolímero o una sal farmacológicamente aceptable del mismo, que contiene, como unidades constituyentes, (a) una o más unidades estructurales que pueden ser iguales o diferentes entre sí, y que se representan mediante la fórmula (I) siguiente



- en donde m es un entero de 3 a 100, Alk representa un grupo alquileo que tiene de 1 a 6 átomos de carbono, y R^1 y R^2 son iguales o diferentes, y cada uno representa un átomo de hidrógeno o un grupo alquilo que tiene de 1 a 6 átomos de carbono que puede ser sustituido opcionalmente con por lo menos
- 20 un sustituyente seleccionado del grupo que consiste de grupos hidroxí, átomos de halógeno y grupos anilo que tienen de 6 a 14 átomos de carbono que pueden ser sustituidos opcionalmente con 1 a 5 sustituyentes seleccionados de los sustituyentes A definidos más adelante, y (b) una o más

unidades estructurales que pueden ser iguales o diferentes entre sí, y que se representan mediante la fórmula (II)



en donde R^3 representa un grupo hidroxilo, un grupo alcoxi que tiene de 1 a 6 átomos de carbono que puede ser sustituido opcionalmente con por lo menos un sustituyente seleccionado del grupo que consiste de grupos hidroxilo, átomos de halógeno y grupos anilo que tienen de 6 a 14 átomos de carbono que pueden ser sustituidos opcionalmente con 1 a 5 sustituyentes seleccionados de los sustituyentes A definidos más adelante, un grupo anloxi que tiene de 6 a 14 átomos de carbono que puede ser sustituido opcionalmente con 1 a 5 sustituyentes seleccionados de los sustituyentes A definidos más adelante, o un grupo representado por la fórmula $-\text{NR}^4\text{R}^5$, en donde R^4 y R^5 son iguales o diferentes entre sí, y cada uno representa un átomo de hidrógeno o un grupo alquilo que tiene de 1 a 6 átomos de carbono que puede ser sustituido opcionalmente con por lo menos un sustituyente seleccionado del grupo que consiste de grupos hidroxilo, átomos de halógeno y grupos anilo que tienen de 6 a 14 átomos de carbono que pueden ser sustituidos opcionalmente con 1 a 5 sustituyentes seleccionados de los sustituyentes A definidos más adelante, los sustituyentes A se seleccionan de grupos alquilo que tienen de 1 a 6 átomos de carbono, grupos alcoxi que

tienen de 1 a 6 átomos de carbono, átomos de halógeno, grupos hidroxí, grupos nitro y grupos carboxi

2 - El copolímero o una sal farmacológicamente aceptable del mismo de conformidad con la reivindicación 1, caracterizado además porque
5 las unidades estructurales representadas por la fórmula (I), y las unidades estructurales representadas por la fórmula (II), están dispuestas en una secuencia alterna de cabeza a cabeza, una secuencia alterna de cabeza a cola, o una secuencia mixta alterna de cabeza a cabeza y cabeza a cola

3 - El copolímero o una sal farmacológicamente aceptable del
10 mismo de conformidad con la reivindicación 1, caracterizado además porque las unidades estructurales representadas por la fórmula (I), y las unidades estructurales representadas por la fórmula (II), están dispuestas en una secuencia aleatoria

4 - El copolímero o una sal farmacológicamente aceptable del
15 mismo de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, caracterizado además porque Alk es un grupo etileno o trimetileno

5 - El copolímero o una sal farmacológicamente aceptable del mismo de conformidad con la reivindicación 4, caracterizado además porque Alk es un grupo etileno

20 6 - El copolímero o una sal farmacológicamente aceptable del mismo de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, caracterizado además porque m es un entero de 3 a 50

7 - El copolímero o una sal farmacológicamente aceptable del

mismo de conformidad con la reivindicación 6, caracterizado además porque m es un entero de 3 a 40

8 - El copolímero o una sal farmacológicamente aceptable del mismo de conformidad con la reivindicación 7, caracterizado además porque m es un entero de 6 a 16 ó 28 a 38

9 - El copolímero o una sal farmacológicamente aceptable del mismo de conformidad con la reivindicación 8, caracterizado además porque m es un entero de 6 a 16

10 - El copolímero o una sal farmacológicamente aceptable del mismo de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, caracterizado además porque R^1 es un átomo de hidrógeno o un grupo metilo

11 - El copolímero o una sal farmacológicamente aceptable del mismo de conformidad con la reivindicación 10, caracterizado además porque R^1 es un átomo de hidrógeno

12 - El copolímero o una sal farmacológicamente aceptable del mismo de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 11, caracterizado además porque R^2 es un átomo de hidrógeno o un grupo metilo

13 - El copolímero o una sal farmacológicamente aceptable del mismo de conformidad con la reivindicación 12, caracterizado además porque R^2 es un grupo metilo

14 - El copolímero o una sal farmacológicamente aceptable del mismo de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 13, caracterizado además porque R^3 es un grupo hidroxilo, un grupo alcoxi que

tiene de 1 a 6 átomos de carbono, o un grupo representado por la fórmula –
NR⁴R⁵, en donde R⁴ y R⁵ son iguales o diferentes, y cada uno representa un
átomo de hidrógeno o un grupo alquilo que tiene de 1 a 6 átomos de carbono

15 - El copolímero o una sal farmacológicamente aceptable del
5 mismo de conformidad con la reivindicación 14, caracterizado además porque
R³ es un grupo hidroxilo o un grupo alcoxi que tiene de 1 a 6 átomos de
carbono

16 - El copolímero o una sal farmacológicamente aceptable del
mismo de conformidad con la reivindicación 15, caracterizado además porque
10 comprende por lo menos una unidad estructural representada por la fórmula
(II), en donde R³ es un grupo alcoxi que tiene de 1 a 6 átomos de carbono, y
opcionalmente por lo menos una unidad estructural representada por la
fórmula (II), en donde R³ es un grupo hidroxilo, en donde la relación entre las
unidades estructurales representadas por la fórmula (II), en donde R³ es un
15 grupo hidroxilo, y las unidades estructurales representadas por la fórmula (II),
en donde R³ es un grupo alcoxi que tiene de 1 a 6 átomos de carbono, está en
la escala de 4 6 a 0 10

17 - El copolímero o una sal farmacológicamente aceptable del
mismo de conformidad con las reivindicaciones 15 ó 16, caracterizado
20 además porque R³ es un grupo alcoxi que tiene de 1 a 6 átomos de carbono

18 - El copolímero o una sal farmacológicamente aceptable del
mismo de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 15 a 17,
caracterizado además porque dicho grupo alcoxi que tiene de 1 a 6 átomos de

carbono, es un grupo etoxi

19 - El copolímero o una sal farmacológicamente aceptable del mismo de conformidad con la reivindicación 14, caracterizado además porque R^3 es un grupo hidroxilo o un grupo representado por la fórmula $-NR^4R^5$, en
5 donde R^4 y R^5 son iguales o diferentes, y cada uno representa un átomo de hidrógeno o un grupo alquilo que tiene de 1 a 6 átomos de carbono

20 - El copolímero o una sal farmacológicamente aceptable del mismo de conformidad con la reivindicación 19, caracterizado además porque comprende por lo menos una unidad estructural representada por la fórmula
10 (II), en donde R^3 es un grupo representado por la fórmula $-NR^4R^5$, en donde R^4 y R^5 son iguales o diferentes, y cada uno representa un átomo de hidrógeno o un grupo alquilo que tiene de 1 a 6 átomos de carbono, y opcionalmente por lo menos una unidad estructural representada por la fórmula (II), en donde R^3 es un grupo hidroxilo, en donde la relación entre las
15 unidades estructurales representadas por la fórmula (II) en donde R^3 es un grupo hidroxilo, y las unidades estructurales representadas por la fórmula (II) en donde R^3 es un grupo representado por la fórmula $-NR^4R^5$, está en la escala de 5 5 a 0 10

21 - El copolímero o una sal farmacológicamente aceptable del
20 mismo de conformidad con la reivindicación 20, caracterizado además porque la relación entre las unidades estructurales representadas por la fórmula (II), en donde R^3 es un grupo hidroxilo, y las unidades estructurales representadas por la fórmula (II), en donde R^3 es un grupo representado por la fórmula –

NR^4R^5 , está en la escala de 4 6 a 0 10

22 - El copolímero o una sal farmacológicamente aceptable del mismo de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 19 a 21, caracterizado además porque R^3 es un grupo representado por la fórmula –
 5 NR^4R^5 , en donde R^4 y R^5 son iguales o diferentes, y cada uno representa un átomo de hidrógeno o un grupo alquilo que tiene de 1 a 6 átomos de carbono

23 - El copolímero o una sal farmacológicamente aceptable del mismo de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 19 a 22, caracterizado además porque el grupo representado por la fórmula $-\text{NR}^4\text{R}^5$ es
 10 un grupo amino, un grupo metilamino o un grupo dimetilamino

24 - El copolímero o una sal farmacológicamente aceptable del mismo de conformidad con la reivindicación 23, caracterizado además porque el grupo representado por la fórmula $-\text{NR}^4\text{R}^5$ es un grupo amino

25 - El copolímero o una sal farmacológicamente aceptable del mismo de conformidad con la reivindicación 23, caracterizado además porque el grupo representado por la fórmula $-\text{NR}^4\text{R}^5$ es un grupo dimetilamino
 15

26 - El copolímero o una sal farmacológicamente aceptable del mismo de conformidad con la reivindicación 14, caracterizado además porque R^3 es un grupo hidroxilo

20 27 - El copolímero o una sal farmacológicamente aceptable del mismo de conformidad con la reivindicación 14, caracterizado además porque R^3 es un grupo 1-amino-2-propanol

28 - El copolímero o una sal farmacológicamente aceptable del

mismo de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 27, caracterizado además porque la relación entre la unidad estructural representada por la fórmula (I), y la unidad estructural representada por la fórmula (II), está en la escala de 10¹ a 10¹⁰,

5 29 - El copolímero o una sal farmacológicamente aceptable del mismo de conformidad con la reivindicación 28, caracterizado además porque la relación entre la unidad estructural representada por la fórmula (I), y la unidad estructural representada por la fórmula (II), está en la escala de 3¹ a 1⁸

10 30 - El copolímero o una sal farmacológicamente aceptable del mismo de conformidad con la reivindicación 28, caracterizado además porque la relación entre la unidad estructural representada por la fórmula (I), y la unidad estructural representada por la fórmula (II), está en la escala de 2¹ a 1² ó 1² a 1⁶

15 31 - El copolímero o una sal farmacológicamente aceptable del mismo de conformidad con la reivindicación 28, caracterizado además porque la relación entre la unidad estructural representada por la fórmula (I), y la unidad estructural representada por la fórmula (II), es de 1¹, o está en la escala de 1² a 1⁴

20 32 - El copolímero o una sal farmacológicamente aceptable del mismo de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 31, caracterizado además porque el grado de polimerización promedio está en la escala de 5 a 200

33 - El copolímero o una sal farmacológicamente aceptable del mismo de conformidad con la reivindicación 32, caracterizado además porque el grado de polimerización promedio está en la escala de 5 a 50

5 34 - El copolímero o una sal farmacológicamente aceptable del mismo de conformidad con la reivindicación 33, caracterizado además porque el grado de polimerización promedio está en la escala de 5 a 20

35 - El copolímero o una sal farmacológicamente aceptable del mismo de conformidad con la reivindicación 32, caracterizado además porque el grado de polimerización promedio está en la escala de 20 a 30

10 36 - El copolímero o una sal farmacológicamente aceptable del mismo de conformidad con la reivindicación 32, caracterizado además porque el grado de polimerización promedio está en la escala de 30 a 40

37 - El copolímero o una sal farmacológicamente aceptable del mismo de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 31, caracterizado además porque el radio de Stokes del mismo es de 9.3 nm o menos

38 - El copolímero o una sal farmacológicamente aceptable del mismo de conformidad con la reivindicación 37, caracterizado además porque el radio de Stokes del mismo es de 7.3 nm o menos

20 39 - El copolímero o una sal farmacológicamente aceptable del mismo de conformidad con la reivindicación 38, caracterizado además porque el radio de Stokes del mismo es de 6.2 nm o menos

40 - El copolímero o una sal farmacológicamente aceptable del

mismo de conformidad con la reivindicación 39, caracterizado además porque el radio de Stokes del mismo es de 4 7 nm o menos

41 - El copolímero o una sal farmacológicamente aceptable del mismo de conformidad con la reivindicación 40, caracterizado además porque
5 el radio de Stokes del mismo es de 3 1 nm o menos

42 - El copolímero o una sal farmacológicamente aceptable del mismo de conformidad con la reivindicación 37, caracterizado además porque el radio de Stokes del mismo está en la escala de 1 5 nm a 4 7 nm

43 - El copolímero o una sal farmacológicamente aceptable del
10 mismo de conformidad con la reivindicación 37, caracterizado además porque el radio de Stokes del mismo está en la escala de 3 1 nm a 6 2 nm

44 - El copolímero o una sal farmacológicamente aceptable del mismo de conformidad con la reivindicación 1, caracterizado además porque m es un entero de 3 a 100, Alk representa un grupo alquileo que tiene de 1 a
15 6 átomos de carbono, R¹ y R² son iguales o diferentes, y cada uno representa un átomo de hidrógeno o un grupo alquilo que tiene de 1 a 6 átomos de carbono, y R³ representa un grupo hidroxilo, un grupo alcoxi que tiene de 1 a 6 átomos de carbono que puede ser sustituido opcionalmente con un grupo hidroxilo, o un grupo representado por la fórmula -NR⁴R⁵, en donde R⁴ y R⁵ son
20 iguales o diferentes entre sí, y cada uno representa un átomo de hidrógeno o un grupo alquilo que tiene de 1 a 6 átomos de carbono que puede ser sustituido opcionalmente con un grupo hidroxilo

45 - El copolímero o una sal farmacológicamente aceptable del

mismo de conformidad con la reivindicación 1, caracterizado además porque Alk representa un grupo etileno, R^1 representa un átomo de hidrógeno, R^2 representa un grupo metilo, y m R^3 la relación de las unidades estructurales de fórmulas (I) y (II) (la relación de la composición) y, cuando sea relevante, la

5 relación entre las unidades de fórmula (II), en donde R^3 representa un grupo hidroxil, y las unidades de fórmula (II), en donde R^3 representa un grupo diferente de hidroxil (la relación de hidrólisis), se seleccionan de los siguientes

(i) m es de 6 a 16, R^3 es un grupo hidroxil, la relación de la composición es de 1 1, y el grado de polimerización promedio es de 30 a 40, (ii) m es de 28 a 38,

10 R^3 es un grupo hidroxil, la relación de la composición es de 1 1, y el grado de polimerización promedio es de 10 a 15, (iii) m es de 6 a 16, R^3 es un grupo amino, la relación de la composición es de 1 1, y el grado de polimerización promedio es de 30 a 40, (iv) m es de 6 a 16, R^3 es un grupo dimetilamino, la

relación de la composición es de 1 1, y el grado de polimerización promedio es de 30 a 40, (v) m es de 6 a 16, R^3 es un grupo 1-amino-2-propanol, la

15 relación de la composición es de 1 1, y el grado de polimerización promedio es de 30 a 40, (vi) m es de 6 a 16, R^3 se selecciona de grupos etoxil e hidroxil, la relación de la composición es de 1 1, el grado de polimerización promedio es de 30 a 40, y la relación de hidrólisis es de 4 6, (vii) m es de 28 a 16, R^3 se

20 selecciona de grupos amino e hidroxil, la relación de la composición es de 1 1, el grado de polimerización promedio es de 10 a 15, y la relación de hidrólisis es de 4 6, (viii) m es de 28 a 38, R^3 es un grupo dimetilamino, la relación de la composición es de 1 1, y el grado de polimerización promedio es de 10 a 15,

- (ix) m es de 6 a 16, R^3 se selecciona de grupos amino e hidroxí, la relación de la composición es de 1 1, el grado de polimerización promedio es de 30 a 40, la relación de hidrólisis es de 3 1 6 9, y el copolímero es una sal de sodio, (x) m es de 6 a 16, R^3 se selecciona de grupos amino e hidroxí, la relación de la
- 5 composición es de 1 1, el grado de polimerización promedio es de 30 a 40, y la relación de hidrólisis es de 1 4 8 6, (xi) m es de 6 a 16, R^3 se selecciona de grupos dimetilamino e hidroxí, la relación de la composición es de 1 1, el grado de polimerización promedio es de 30 a 40, la relación de hidrólisis es de 2 9 7 1, y el copolímero es una sal de sodio, (xii) m es de 6 a 16, R^3 es un
- 10 grupo amino, la relación de la composición es de 1 2 4, y el grado de polimerización promedio es de 20 a 30, (xiii) m es de 6 a 16, R^3 se selecciona de grupos amino e hidroxí, la relación de la composición es de 1 2 4, el grado de polimerización promedio es de 20 a 30, y la relación de hidrólisis es de 0 4 9 6, (xiv) m es de 6 a 16, R^3 se selecciona de grupos amino e hidroxí, la
- 15 relación de la composición es de 1 2 4, el grado de polimerización promedio es de 20 a 30, y la relación de hidrólisis es de 2 9 7 1, (xv) m es de 6 a 16, R^3 se selecciona de grupos amino e hidroxí, la relación de la composición es de 1 2 4, el grado de polimerización promedio es de 20 a 30, y la relación de hidrólisis es de 0 9 9 1, (xvi) m es de 6 a 16, R^3 se selecciona de grupos
- 20 amino e hidroxí, la relación de la composición es de 1 2 4, el grado de polimerización promedio es de 20 a 30, y la relación de hidrólisis es de 0 5 9 5, (xvii) m es de 6 a 16, R^3 se selecciona de grupos amino e hidroxí, la relación de la composición es de 1 2 4, el grado de polimerización promedio

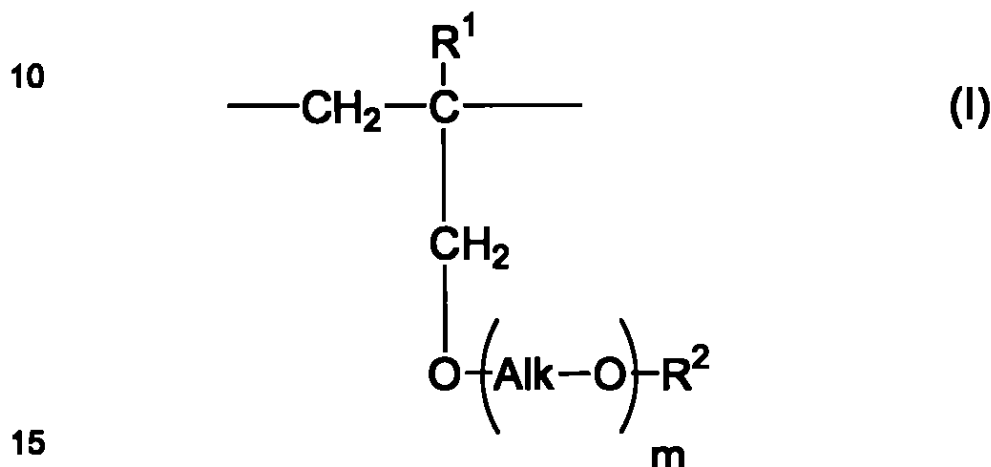
es de 20 a 30, y la relación de hidrólisis es de 1 3 8 7, (xviii) m es de 6 a 16, R^3 se selecciona de grupos amino e hidroxil, la relación de la composición es de 1 2 4, el grado de polimerización promedio es de 20 a 30, y la relación de hidrólisis es de 1 9 8 1, (xix) m es de 6 a 16, R^3 se selecciona de grupos amino e hidroxil, la relación de la composición es de 1 2 4, el grado de polimerización promedio es de 20 a 30, y la relación de hidrólisis es de 1 0 9 0, (xx) m es de 6 a 16, R^3 se selecciona de grupos amino e hidroxil, la relación de la composición es de 1 2 4, el grado de polimerización promedio es de 20 a 30, y la relación de hidrólisis es de 0 8 9 2, (xxi) m es de 6 a 16, R^3 se selecciona de grupos amino e hidroxil, la relación de la composición es de 1 2 4, el grado de polimerización promedio es de 20 a 30, y la relación de hidrólisis es de 4 6 5 4, (xxii) m es de 6 a 16, R^3 se selecciona de grupos amino e hidroxil, la relación de la composición es de 1 2 4, el grado de polimerización promedio es de 20 a 30, y la relación de hidrólisis es de 1 2 8 8, (xxiii) m es de 6 a 16, R^3 se selecciona de grupos amino e hidroxil, la relación de la composición es de 1 2 4, el grado de polimerización promedio es de 20 a 30, y la relación de hidrólisis es de 2 0 8 0, (xxiv) m es de 6 a 16, R^3 se selecciona de grupos amino e hidroxil, la relación de la composición es de 1 2 4, el grado de polimerización promedio es de 20 a 30, y la relación de hidrólisis es de 1 1 8 9, (xxv) m es de 6 a 16, R^3 se selecciona de grupos amino e hidroxil, la relación de la composición es de 1 2 4, el grado de polimerización promedio es de 20 a 30, y la relación de hidrólisis es de 2 4 7 6, (xxvi) m es de 6 a 16, R^3 se selecciona de grupos amino e hidroxil, la

relación de la composición es de 1 2 4, el grado de polimerización promedio es de 20 a 30, y la relación de hidrólisis es de 0 9 9 1, (xxvii) m es de 6 a 16, R^3 se selecciona de grupos amino e hidroxil, la relación de la composición es de 1 2 4, el grado de polimerización promedio es de 20 a 30, y la relación de hidrólisis es de 1 5 8 5, (xxviii) m es de 6 a 16, R^3 se selecciona de grupos amino e hidroxil, la relación de la composición es de 1 2 4, el grado de polimerización promedio es de 20 a 30, y la relación de hidrólisis es de 0 7 9 3, (xxx) m es de 6 a 16, R^3 se selecciona de grupos amino e hidroxil, la relación de la composición es de 1 2 4, el grado de polimerización promedio es de 20 a 30, y la relación de hidrólisis es de 4 5 5 5, (xxx) m es de 6 a 16, R^3 se selecciona de grupos amino e hidroxil, la relación de la composición es de 1 2 4, el grado de polimerización promedio es de 20 a 30, y la relación de hidrólisis es de 1 4 8 6, (xxxi) m es de 6 a 16, R^3 se selecciona de grupos amino e hidroxil, la relación de la composición es de 1 2 4, el grado de polimerización promedio es de 20 a 30, y la relación de hidrólisis es de 0 7 9 3, (xxxii) m es de 6 a 16, R^3 se selecciona de grupos amino e hidroxil, la relación de la composición es de 1 2 4, el grado de polimerización promedio es de 20 a 30, y la relación de hidrólisis es de 0 8 9 2, (xxxiii) m es de 6 a 16, R^3 se selecciona de grupos amino e hidroxil, la relación de la composición es de 1 2 4, el grado de polimerización promedio es de 20 a 30, y la relación de hidrólisis es de 1 4 8 6, (xxxiv) m es de 6 a 16, R^3 se selecciona de grupos amino e hidroxil, la relación de la composición es de 1 2 4, el grado de polimerización promedio es de 20 a 30, y la relación de hidrólisis es de

0 7 9 3, (xxxv) m es de 6 a 16, R^3 se selecciona de grupos amino e hidroxil, la relación de la composición es de 1 2 4, el grado de polimerización promedio es de 20 a 30, y la relación de hidrólisis es de 0 9 9 1, (xxxvi) m es de 6 a 16, R^3 se selecciona de grupos amino e hidroxil, la relación de la composición es de 1 2 4, el grado de polimerización promedio es de 20 a 30, y la relación de hidrólisis es de 1 9 8 1, (xxxvii) m es de 6 a 16, R^3 se selecciona de grupos amino e hidroxil, la relación de la composición es de 1 3, el grado de polimerización promedio es de 20 a 30, y la relación de hidrólisis es de 3 1 6 9, (xxxviii) m es de 6 a 16, R^3 se selecciona de grupos amino e hidroxil, la relación de la composición es de 1 1, la relación de hidrólisis es de 1 4 8 6, y el radio de Stokes es de 9 3 nm o menos, (xxxix) m es de 6 a 16, R^3 se selecciona de grupos amino e hidroxil, la relación de la composición es de 1 1, la relación de hidrólisis es de 1 4 8 6, y el radio de Stokes está en la escala de 3 1 a 6 2 nm, (xli) m es de 6 a 16, R^3 se selecciona de grupos amino e hidroxil, la relación de la composición es de 1 1, la relación de hidrólisis es de 1 4 8 6, y el radio de Stokes está en la escala de 1 5 a 4 7 nm, (xlii) m es de 6 a 16, R^3 se selecciona de grupos amino e hidroxil, la relación de la composición es de 1 1, la relación de hidrólisis es de 1 4 8 6, y el radio de Stokes es de 3 1 nm o menos, (xliii) m es de 6 a 16, R^3 se selecciona de grupos amino e hidroxil, la relación de la composición es de 1 1, la relación de hidrólisis es de 1 4 8 6, y el radio de Stokes es de 7 8 nm o menos, (xliv) m es de 6 a 16, R^3 se selecciona de grupos amino e hidroxil, la relación de la composición es de 1 1, la relación de hidrólisis es de 1 4 8 6, y el radio de Stokes es de 6 2 nm o

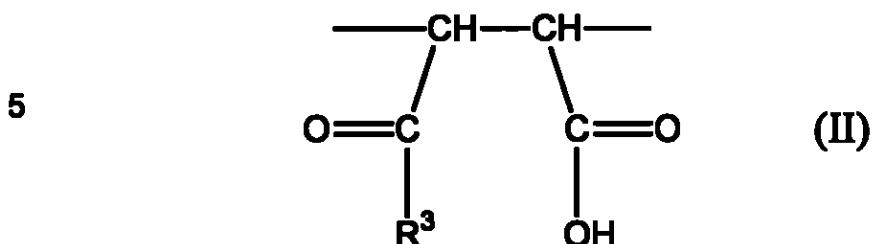
menos, y (xiv) m es de 6 a 16, R³ se selecciona de grupos amino e hidroxil, la relación de la composición es de 1 1, la relación de hidrólisis es de 1 4 8 6, y el radio de Stokes es de 4 7 nm o menos

46 - Un copolímero o una sal farmacológicamente aceptable del mismo, que se obtiene sometiendo una o más porciones de anhídrido carboxílico de fórmula (III) en un copolímero que contiene, como unidades constituyentes, (a) una o más unidades estructurales que pueden ser iguales o diferentes entre sí, y que se representan mediante la fórmula (I) siguiente



en donde m es un entero de 3 a 100, Alk representa un grupo alquileo que tiene de 1 a 6 átomos de carbono, y R¹ y R² son iguales o diferentes, y cada uno representa un átomo de hidrógeno o un grupo alquilo que tiene de 1 a 6 átomos de carbono que puede ser sustituido opcionalmente con por lo menos un sustituyente seleccionado del grupo que consiste de grupos hidroxil, átomos de halógeno y grupos anillo que tienen de 6 a 14 átomos de carbono que pueden ser sustituidos opcionalmente con 1 a 5 sustituyentes

seleccionados de los sustituyentes A definidos más adelante, y (b) dicha unidad estructural comprendiendo una porción de anhídrido carboxílico de fórmula (III)



a una o más reacciones seleccionadas del grupo que consiste de (i) hidrólisis, (ii) amoniólisis, (iii) aminólisis y (iv) alcoholólisis, los sustituyentes A se
 10 seleccionan de grupos alquilo que tienen de 1 a 6 átomos de carbono, grupos alcoxi que tienen de 1 a 6 átomos de carbono, átomos de halógeno, grupos hidroxi, grupos nitro y grupos carboxi

47 - El copolímero o una sal farmacológicamente aceptable del mismo de conformidad con la reivindicación 46, caracterizado además porque
 15 la unidad estructural representada por la fórmula (I), y la unidad estructural representada por la fórmula (III) en el copolímero, están dispuestas en una secuencia alterna de cabeza a cabeza, una secuencia alterna de cabeza a cola, o una secuencia mixta alterna de cabeza a cabeza y cabeza a cola

48 - El copolímero o una sal farmacológicamente aceptable del
 20 mismo de conformidad con la reivindicación 46, caracterizado además porque la unidad estructural representada por la fórmula (I), y la unidad estructural representada por la fórmula (III) en el copolímero, están dispuestas en secuencia aleatoria

49 - El copolímero o una sal farmacológicamente aceptable del mismo de conformidad con las reivindicaciones 46 a 48, caracterizado además porque Alk es un grupo etileno o trimetileno

50 - El copolímero o una sal farmacológicamente aceptable del mismo de conformidad con la reivindicación 49, caracterizado además porque Alk es un grupo etileno

51 - El copolímero o una sal farmacológicamente aceptable del mismo de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 46 a 50, caracterizado además porque m es un entero de 3 a 50

52 - El copolímero o una sal farmacológicamente aceptable del mismo de conformidad con la reivindicación 51, caracterizado además porque m es un entero de 3 a 40

53 - El copolímero o una sal farmacológicamente aceptable del mismo de conformidad con la reivindicación 52, caracterizado además porque m es un entero de 6 a 16 ó 28 a 38

54 - El copolímero o una sal farmacológicamente aceptable del mismo de conformidad con la reivindicación 53, caracterizado además porque m es un entero de 6 a 16

55 - El copolímero o una sal farmacológicamente aceptable del mismo de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 46 a 54, caracterizado además porque R¹ es un átomo de hidrógeno o un grupo metilo

56 - El copolímero o una sal farmacológicamente aceptable del mismo de conformidad con la reivindicación 55, caracterizado además porque

R¹ es un átomo de hidrógeno

57 - El copolímero o una sal farmacológicamente aceptable del mismo de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 46 a 56, caracterizado además porque R² es un átomo de hidrógeno o un grupo metilo

58 - El copolímero o una sal farmacológicamente aceptable del mismo de conformidad con la reivindicación 57, caracterizado además porque R² es un grupo metilo

59 - El copolímero o una sal farmacológicamente aceptable del mismo de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 46 a 58, caracterizado además porque la relación entre la unidad estructural representada por la fórmula (I), y la unidad estructural que se obtiene sometiendo una o más unidades estructurales de fórmula (III) a una o más reacciones seleccionadas del grupo que consiste de (i) hidrólisis, (ii) amoniólisis, (iii) aminólisis y (iv) alcoholólisis, está en la escala de 10⁻¹ a 10¹

60 - El copolímero o una sal farmacológicamente aceptable del mismo de conformidad con la reivindicación 59, caracterizado además porque la relación entre la unidad estructural representada por la fórmula (I), y la unidad estructural que se obtiene sometiendo una o más unidades estructurales de fórmula (III) a una o más reacciones seleccionadas del grupo que consiste de (i) hidrólisis, (ii) amoniólisis, (iii) aminólisis y (iv) alcoholólisis, está en la escala de 3⁻¹ a 10¹

61 - El copolímero o una sal farmacológicamente aceptable del mismo de conformidad con la reivindicación 59, caracterizado además porque

la relación entre la unidad estructural representada por la fórmula (I), y la unidad estructural que se obtiene sometiendo una o más unidades estructurales de fórmula (III) a una o más reacciones seleccionadas del grupo que consiste de (i) hidrólisis, (ii) amoníolisis, (iii) aminólisis y (iv) alcoholólisis, está en la escala de 2 1 a 1 2 ó 1 2 a 1 6

62 - El copolímero o una sal farmacológicamente aceptable del mismo de conformidad con la reivindicación 59, caracterizado además porque la relación entre la unidad estructural representada por la fórmula (I), y la unidad estructural que se obtiene sometiendo una o más unidades estructurales de fórmula (III) a una o más reacciones seleccionadas del grupo que consiste de (i) hidrólisis, (ii) amoníolisis, (iii) aminólisis y (iv) alcoholólisis es de 1 1, o está en la escala de 1 2 a 1 4

63 - El copolímero o una sal farmacológicamente aceptable del mismo de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 46 a 62, caracterizado además porque el grado de polimerización promedio está en la escala de 5 a 200

64 - El copolímero o una sal farmacológicamente aceptable del mismo de conformidad con la reivindicación 63, caracterizado además porque el grado de polimerización promedio está en la escala de 5 a 50

65 - El copolímero o una sal farmacológicamente aceptable del mismo de conformidad con la reivindicación 64, caracterizado además porque el grado de polimerización promedio está en la escala de 5 a 20

66 - El copolímero o una sal farmacológicamente aceptable del

mismo de conformidad con la reivindicación 63, caracterizado además porque el grado de polimerización promedio está en la escala de 20 a 30

67 - El copolímero o una sal farmacológicamente aceptable del mismo de conformidad con la reivindicación 63, caracterizado además porque
5 el grado de polimerización promedio está en la escala de 30 a 40

68 - El copolímero o una sal farmacológicamente aceptable del mismo de conformidad con la reivindicación 46, caracterizado además porque m es un entero de 3 a 100, Alk representa un grupo alquileo que tiene de 1 a 6 átomos de carbono, y R^1 y R^2 son iguales o diferentes, y cada uno
10 representa un átomo de hidrógeno o un grupo alquilo que tiene de 1 a 6 átomos de carbono

69 - El copolímero o una sal farmacológicamente aceptable del mismo de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 46 a 68, caracterizado además porque se obtiene sometiendo una porción de anhídrido
15 carboxílico de fórmula (III) en el copolímero, a amonólisis

70 - El copolímero o una sal farmacológicamente aceptable del mismo de conformidad con la reivindicación 69, caracterizado además porque se obtiene llevando a cabo la amonólisis con amoníaco acuoso

71 - El copolímero o una sal farmacológicamente aceptable del mismo de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 46 a 68, caracterizado además porque se obtiene sometiendo una porción de anhídrido
20 carboxílico de fórmula (III) en el copolímero, a aminólisis

72 - El copolímero o una sal farmacológicamente aceptable del

mismo de conformidad con la reivindicación 71, caracterizado además porque se obtiene llevando a cabo la aminólisis usando una solución de dimetilamina acuosa

5 73 - El copolímero o una sal farmacológicamente aceptable del mismo de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 46 a 68, caracterizado además porque se obtiene sometiendo una porción de anhídrido carboxílico de fórmula (III) en el copolímero, a alcoholísis

10 74 - El copolímero o una sal farmacológicamente aceptable del mismo de conformidad con la reivindicación 73, caracterizado además porque se obtiene llevando a cabo la alcoholísis usando etanol

75 - Una composición farmacéutica que comprende un diluyente o vehículo farmacéuticamente aceptable, y por lo menos un copolímero o una sal farmacológicamente aceptable del mismo de la presente invención, de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 74

15 76 - La composición farmacéutica de conformidad con la reivindicación 75, caracterizada además porque dicha composición comprende además por lo menos una proteína o un análogo o variante de la misma

20 77 - La composición farmacéutica de conformidad con la reivindicación 76, caracterizada además porque la proteína o un análogo o variante de la misma es una proteína básica

78 - La composición farmacéutica de conformidad con la reivindicación 77, caracterizada además porque la proteína básica es un factor

básico de crecimiento de fibroblastos (bFGF), un factor de crecimiento epidérmico (EGF), un factor inhibidor de osteoclastogénesis (OCIF), un factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF), un factor neurotrófico derivado de cerebro (BDNF), un factor de crecimiento nervioso (NGF), una hormona de crecimiento humano (HGH), un factor de crecimiento de hepatocitos (HGF), o un factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF), o un análogo o una variante de los mismos

79 - La composición farmacéutica de conformidad con la reivindicación 77, caracterizada además porque la proteína básica es un factor inhibidor de osteoclastogénesis (OCIF), o un análogo o una variante de la misma

80 - La composición farmacéutica de conformidad con la reivindicación 79, caracterizada además porque dicho OCIF o un análogo o variante del mismo es OCIF de tipo natural o de tipo recombinante

81 - La composición farmacéutica de conformidad con la reivindicación 79, caracterizada además porque dicho OCIF o un análogo o variante del mismo es un monómero o un dímero

82 - La composición farmacéutica de conformidad con la reivindicación 79, caracterizada además porque dicho OCIF es un monómero de OCIF de humano que tiene un peso molecular medido mediante SDS-PAGE bajo condiciones no reductoras, de alrededor de 60,000, o un dímero de OCIF de humano que tiene un peso molecular de aproximadamente 120,000 medido mediante SDS-PAGE bajo condiciones no reductoras

83 - La composición farmacéutica de conformidad con la reivindicación 79, caracterizada además porque dicho OCIF comprende los aminoácidos -21 a +380 de SEQ ID NO 1 del listado de secuencias

5 84 - La composición farmacéutica de conformidad con la reivindicación 79, caracterizada además porque dicho OCIF comprende los aminoácidos +1 a +380 de SEQ ID NO 1 del listado de secuencias

85 - Un modificador capaz de modificar una proteína o un análogo o variante de la misma, dicho modificador comprendiendo el copolímero o una sal farmacológicamente aceptable del mismo, de
10 conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 74

86 - El modificador capaz de modificar una proteína o un análogo o variante de la misma de conformidad con la reivindicación 85, caracterizado además porque la proteína es una proteína básica

87 - El modificador capaz de modificar una proteína o un análogo
15 o variante de la misma de conformidad con la reivindicación 86, caracterizado además porque la proteína básica es un factor básico de crecimiento de fibroblastos (bFGF), un factor de crecimiento epidérmico (EGF), un factor inhibidor de osteoclastogénesis (OCIF), un factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF), un factor neurotrófico derivado de cerebro (BDNF), un
20 factor de crecimiento nervioso (NGF), una hormona de crecimiento humano (HGH), un factor de crecimiento de hepatocitos (HGF), o un factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF), o un análogo o una variante de los mismos

88 - El modificador capaz de modificar una proteína o un análogo o variante de la misma de conformidad con la reivindicación 86, caracterizado además porque la proteína básica es un factor inhibidor de osteoclastogénesis (OCIF), o un análogo o una variante de la misma

5 89 - El modificador capaz de modificar una proteína o un análogo o variante de la misma de conformidad con la reivindicación 88, caracterizado además porque dicho OCIF o un análogo o variante del mismo es OCIF de tipo natural o de tipo recombinante

 90 - El modificador capaz de modificar una proteína o un análogo
10 o variante de la misma de conformidad con la reivindicación 88, caracterizado además porque dicho OCIF o un análogo o variante del mismo es un monómero o un dímero

 91 - El modificador capaz de modificar una proteína o un análogo o variante de la misma de conformidad con la reivindicación 88, caracterizado
15 además porque dicho OCIF es un monómero de OCIF de humano que tiene un peso molecular medido mediante SDS-PAGE bajo condiciones no reductoras, de alrededor de 60,000, o un dímero de OCIF de humano que tiene un peso molecular de aproximadamente 120,000 medido mediante SDS-PAGE bajo condiciones no reductoras

20 92 - El modificador capaz de modificar una proteína o un análogo o variante de la misma de conformidad con la reivindicación 88, caracterizado además porque dicho OCIF comprende los aminoácidos -21 a +380 de SEQ ID NO 1 del listado de secuencias

93 - El modificador capaz de modificar una proteína o un análogo o variante de la misma de conformidad con la reivindicación 88, caracterizado además porque dicho OCIF comprende los aminoácidos +1 a +380 de SEQ ID NO 1 del listado de secuencias

5 94 - Un complejo que comprende por lo menos una proteína o un análogo o variante de la misma que se une a por lo menos el copolímero o una sal farmacológicamente aceptable del mismo, de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 74

10 95 - El complejo de conformidad con la reivindicación 94, caracterizado además porque la proteína es una proteína básica

 96 - El complejo de conformidad con la reivindicación 95, caracterizado además porque la proteína básica es un factor básico de crecimiento de fibroblastos (bFGF), un factor de crecimiento epidérmico (EGF), un factor inhibidor de osteoclastogénesis (OCIF), un factor de
15 crecimiento derivado de plaquetas (PDGF), un factor neurotrófico derivado de cerebro (BDNF), un factor de crecimiento nervioso (NGF), una hormona de crecimiento humano (HGH), un factor de crecimiento de hepatocitos (HGF), o un factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF), o un análogo o una variante de los mismos

20 97 - El complejo de conformidad con la reivindicación 95, caracterizado además porque la proteína básica es un factor inhibidor de osteoclastogénesis (OCIF), o un análogo o una variante de la misma

 98 - El complejo de conformidad con la reivindicación 97,

caracterizado además porque dicho OCIF o un análogo o variante del mismo es OCIF de tipo natural o de tipo recombinante

99 - El complejo de conformidad con la reivindicación 97, caracterizado además porque dicho OCIF o un análogo o variante del mismo
5 es un monómero o un dímero

100 - El complejo de conformidad con la reivindicación 97, caracterizado además porque dicho OCIF es un monómero de OCIF de humano que tiene un peso molecular medido mediante SDS-PAGE bajo condiciones no reductoras, de alrededor de 60,000, o un dímero de OCIF de
10 humano que tiene un peso molecular de aproximadamente 120,000 medido mediante SDS-PAGE bajo condiciones no reductoras

101 - El complejo de conformidad con la reivindicación 97, caracterizado además porque dicho OCIF comprende los aminoácidos -21 a +380 de SEQ ID NO 1 del listado de secuencias

15 102 - El complejo de conformidad con la reivindicación 97, caracterizado además porque dicho OCIF comprende los aminoácidos +1 a +380 de SEQ ID NO 1 del listado de secuencias

103 - Una composición farmacéutica que comprende una cantidad efectiva de un agente farmacológicamente activo junto con un
20 vehículo o diluyente para el mismo, en donde dicho agente farmacológicamente activo está en forma del complejo de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 94 a 102

104 - Un método para prolongar el tiempo que una proteína o un

análogo o variante de la misma es retenida en la corriente sanguínea después de administración a un paciente, combinando dicha proteína o un análogo o variante de la misma con por lo menos el copolímero o una sal farmacológicamente aceptable del mismo, de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 74

105 - El método de conformidad con la reivindicación 104, caracterizado además porque la proteína es una proteína básica

106 - El método de conformidad con la reivindicación 105, caracterizado además porque la proteína básica es un factor básico de crecimiento de fibroblastos (bFGF), un factor de crecimiento epidérmico (EGF), un factor inhibidor de osteoclastogénesis (OCIF), un factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF), un factor neurotrófico derivado de cerebro (BDNF), un factor de crecimiento nervioso (NGF), una hormona de crecimiento humano (HGH), un factor de crecimiento de hepatocitos (HGF), o un factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF), o un análogo o una variante de los mismos

107 - El método de conformidad con la reivindicación 105, caracterizado además porque la proteína básica es un factor inhibidor de osteoclastogénesis (OCIF), o un análogo o una variante de la misma

108 - El método de conformidad con la reivindicación 107, caracterizado además porque dicho OCIF o un análogo o variante del mismo es OCIF de tipo natural o de tipo recombinante

109 - El método de conformidad con la reivindicación 107,

caracterizado además porque dicho OCIF o un análogo o variante del mismo es un monómero o un dímero

110 - El método de conformidad con la reivindicación 107, caracterizado además porque dicho OCIF es un monómero de OCIF de humano que tiene un peso molecular medido mediante SDS-PAGE bajo condiciones no reductoras, de alrededor de 60,000, o un dímero de OCIF de humano que tiene un peso molecular de aproximadamente 120,000 medido mediante SDS-PAGE bajo condiciones no reductoras

111 - El método de conformidad con la reivindicación 107, caracterizado además porque dicho OCIF comprende los aminoácidos -21 a +380 de SEQ ID NO 1 del listado de secuencias

112 - El método de conformidad con la reivindicación 107, caracterizado además porque dicho OCIF comprende los aminoácidos +1 a +380 de SEQ ID NO 1 del listado de secuencias

15

113 Métodos de tratamiento o profilaxis de una enfermedad en pacientes susceptibles a proteína o análogo que comprende la administración de una cantidad efectiva de un complejo que comprende dicha proteína o un análogo el cual está unido al menos un copolímero o una sal farmacológicamente aceptable de acuerdo a cualquiera de las reivindicaciones 1 a 74

20

114 Un método de acuerdo a la reivindicación 113 donde la

proteína es una proteína básica

115 Un método de acuerdo a la reivindicación 114 donde la proteína básica es un factor de crecimiento de fibroblasto básico (bFGF), un factor de crecimiento epidermal (EGF), un factor inhibitorio de osteoclastogenesis (OCIF), un factor de crecimiento derivado de plaqueta (PDGF), un factor neurotrófico derivado del cerebro (BDNF), un factor de crecimiento del nervio(NGF), una hormona de crecimiento humano (HGH), un factor de crecimiento de hepatocito (HGF), o un factor de crecimiento vascular endotelial (VEGF) o un análogo o una variante de la misma

116 Un método de acuerdo a la reivindicación 114, donde la proteína básica es un factor inhibitorio de osteoclastogenesis (OCIF) o un análogo o una variante de la misma

15

117 Una composición farmacéutica de acuerdo a la reivindicación 116, en donde dicha OCIF o un análogo o variante de la misma es un tipo natural o recombinante de OCIF

20 118 Un método de acuerdo a la reivindicación 116, en donde dicho OCIF o análogo o variante de la misma es un monómero o un dímero

119 Un método de acuerdo a la reivindicación 116, en donde

dicho OCIF es un monómero de OCIF humano que tiene un peso molecular de 60000 medido mediante SDS-PAGE bajo condiciones no reductoras o un dímero de OCIF humano que tiene un peso molecular de 120000 medido mediante SDS-PAGE bajo condiciones no reductoras

5

120 Un método de acuerdo a la reivindicación 116, en donde dicha OCIF comprende los aminoácidos +21 a +380 de SEQ ID NO 1 del listado de secuencias

10

121 Un método de acuerdo a la reivindicación 116, en donde dicha OCIF comprende los aminoácidos +1 a +380 de SEQ ID NO 1 del listado de secuencias

15

122 Un método de acuerdo a cualquiera de las reivindicaciones 116 a 121, en donde dicha enfermedad es una enfermedad metabólica del hueso

20

123 - El uso del complejo que comprende una proteína o un análogo o variante de la misma que se une a por lo menos un copolímero o una sal farmacológicamente aceptable del mismo, como el que se reclama en cualquiera de las reivindicaciones 1 a 74, en la fabricación de un medicamento para el tratamiento o profilaxis de una enfermedad susceptible a dicha proteína o un análogo o variante de la misma

124 - El uso como se reclama en la reivindicación 122, en donde la proteína es una proteína básica

125 - El uso como se reclama en la reivindicación 123, en donde la proteína básica es un factor básico de crecimiento de fibroblastos (bFGF),
5 un factor de crecimiento epidérmico (EGF), un factor inhibidor de osteoclastogénesis (OCIF), un factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF), un factor neurotrófico derivado de cerebro (BDNF), un factor de crecimiento nervioso (NGF), una hormona de crecimiento humano (HGH), un factor de crecimiento de hepatocitos (HGF), o un factor de crecimiento
10 endotelial vascular (VEGF), o un análogo o una variante de los mismos

126 - El uso como se reclama en la reivindicación 123, en donde la proteína básica es un factor inhibidor de osteoclastogénesis (OCIF), o un análogo o una variante de la misma

127 - El uso como se reclama en la reivindicación 126, en donde
15 dicho OCIF o un análogo o variante del mismo es OCIF de tipo natural o de tipo recombinante

128 - El uso como se reclama en la reivindicación 126, en donde dicho OCIF o un análogo o variante del mismo es un monómero o un dímero

129 - El uso como se reclama en la reivindicación 126, en donde
20 dicho OCIF es un monómero de OCIF humano que tiene un peso molecular medido mediante SDS-PAGE bajo condiciones no reductoras, de alrededor de 60,000, o un dímero de OCIF de humano que tiene un peso molecular de aproximadamente 120,000 medido mediante SDS-PAGE bajo

condiciones no reductoras

130 - El uso como se reclama en la reivindicación 116, en donde dicho OCIF comprende los aminoácidos -21 a +380 de SEQ ID NO 1 del listado de secuencias

5 131 - El uso como se reclama en la reivindicación 116, en donde dicho OCIF comprende los aminoácidos +1 a +380 de SEQ ID NO 1 del listado de secuencias

132 - El uso como se reclama en cualquiera de las reivindicaciones 126 a 131, en donde dicha enfermedad es una enfermedad
10 metabólica ósea

15

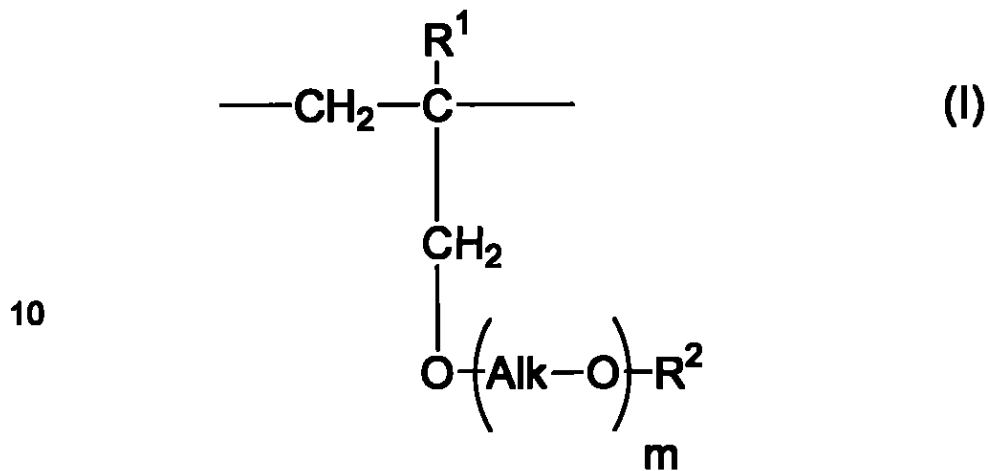
20

COLO 01579-841-018-7
JDF/WPCL1579/ID-000158

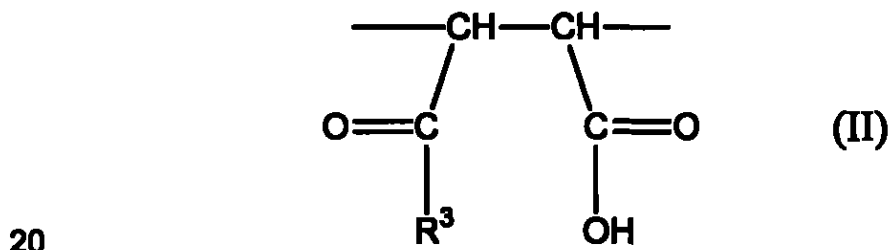
25

RESUMEN DE LA INVENCION

Se provee un copolímero o una sal farmacológicamente aceptable del mismo que contiene, como unidades constituyentes, (a) una o
5 más unidades estructurales de fórmula (I)



en donde m es un entero de 3 a 100, Alk representa un grupo alquileno, y R¹ y R² son iguales o diferentes, y cada uno representa hidrógeno o alquilo
15 sustituido opcionalmente, y (b) una o más unidades estructurales de fórmula (II)



en donde R³ representa hidroxilo, alcoxi sustituido opcionalmente, anloxi sustituido opcionalmente, o un grupo representado por la fórmula -NR⁴R⁵, en
donde R⁴ y R⁵ son iguales o diferentes entre sí, y cada uno representa

hidrógeno o alquilo sustituido opcionalmente, se provee además una
composición farmacéutica que comprende dicho copolímero, un modificador
de proteínas que comprende dicho copolímero, un complejo de dicho
copolímero con una proteína, un método para prevenir o tratar enfermedades
5 usando dicho complejo, el uso de dicho complejo en la fabricación de un
medicamento para prevenir o tratar enfermedades, y métodos para la síntesis
de dichos copolímeros y dichos complejos

10

15

MG

P04/338F

20

COLO 01579-841-018-7
PRP/WPCL1579/ID-000156

SEQUENCE LISTING

<110> Sankyo Company Limited

5

<120> Polymeric modifiers and pharmaceutical compositions

10 <130> sankyoFP0406

<150> JP2003-80389

<151> 2003-03-24

15

<150> JP2003-355835

<151> 2003-10-16

20

<150> JP2003-426598

<151> 2003-12-24

25

<160> 1

2

300

<170> PatentIn version 3 1

5

<210> 1
<211> 401
<212> PRT
<213> Homo sapiens

10

<220>
<223> Inventor Kasuya Yuji
15 Inventor Hnoma Masahi

<220>
<221> SIGNAL
<222> (-21) (-1)

20

<223>

<220>
<221> mat_peptide
25 <222> (+1) (+380)

<223>

301

<400> 1

Met Asn Asn Leu Leu Cys Cys Ala Leu Val Phe Leu Asp Ile Ser Ile

-20

-15

-10

5

Lys Trp Thr Thr Gln Glu Thr Phe Pro Pro Lys Tyr Leu His Tyr Asp

-5

-1 1

5

10

10

Glu Glu Thr Ser His Gln Leu Leu Cys Asp Lys Cys Pro Pro Gly Thr

15

20

25

15

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

20

45

50

55

Leu Tyr Cys Ser Pro Val Cys Lys Glu Leu Gln Tyr Val Lys Gln Glu

60

65

70

75

25

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
 5

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

10

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

15

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
 20 160 165 170

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

25

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

5

Lys Arg Gln His Ser Ser Gln Glu Gln Thr Phe Gln Leu Leu Lys Leu

220

225

230

235

10

Trp Lys His Gln Asn Lys Asp Gln Asp Ile Val Lys Lys Ile Ile Gln

240

245

250

15

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

20

270

275

280

Lys Lys Val Gly Ala Glu Asp Ile Glu Lys Thr Ile Lys Ala Cys Lys

285

290

295

25

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

10

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

15

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

20

Leu
380

PCT REQUEST

Original (for SUBMISSION)

Co.
3071

0	For receiving Office use only	
0-1	International Application No.	
0-2	International Filing Date	
0-3	Name of receiving Office and "PCT International Application"	



0-4	Form PCT/RO/01 PCT Request	
0-4 1	Prepared Using	PCT-SAFE [EASY mode] Version 3 50 (Build 0002.158)
0-5	Petition The undersigned requests that the present international application be processed according to the Patent Cooperation Treaty	
0-6	Receiving Office (specified by the applicant)	Japan Patent Office (RO/JP)
0-7	Applicant's or agent's file reference	sankyoFP0406
I	Title of invention	Polymeric modifiers and pharmaceutical compositions
II	Applicant	
II 1	This person is	applicant only
II-2	Applicant for	all designated States except US
II-4	Name	SANKYO COMPANY, LIMITED
II-5	Address	5-1, Nihonbashi Honcho 3-chome, Chuo-ku, Tokyo 1038426 Japan
II-6	State of nationality	JP
II 7	State of residence	JP
III 1	Applicant and/or inventor	
III-1 1	This person is	applicant and inventor
III 1-2	Applicant for	US only
III 1-4	Name (LAST First)	KASUYA, Yuji
III-1 5	Address	c/o SANKYO COMPANY, LIMITED, 2-58, Hiramachi 1-chome, Shinagawa-ku, Tokyo 1408710 Japan
III-1-6	State of nationality	JP
III-1 7	State of residence	JP

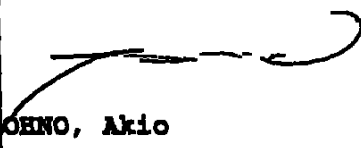
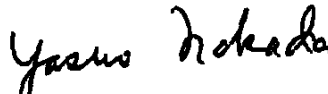
PCT REQUEST

Original (for SUBMISSION)

IV-4	Additional agent(s)	agent
IV-4-1	Name (LAST First)	ECHIGO, Tomoki
IV-4-3	Telephone No	0354368663
IV-4-4	Facsimile No	0354368583
IV-4-5	e-mail	
IV-4-6	Agent's registration No.	
V	DESIGNATIONS	
V 1	The filing of this request constitutes under Rule 4.9(a), the designation of all Contracting States bound by the PCT on the international filing date, for the grant of every kind of protection available and, where applicable, for the grant of both regional and national patents.	
VI-1	Priority claim of earlier national application	
VI-1 1	Filing date	24 March 2003 (24 03 2003)
VI-1 2	Number	2003-080389
VI 1-3	Country	JP
VI-2	Priority claim of earlier national application	
VI-2 1	Filing date	16 October 2003 (16 10 2003)
VI-2-2	Number	2003-355853
VI 2-3	Country	JP
VI-3	Priority claim of earlier national application	
VI-3-1	Filing date	24 December 2003 (24 12 2003)
VI 3-2	Number	2003-426598
VI-3-3	Country	JP
VI-4	Priority document request The receiving Office is requested to prepare and transmit to the International Bureau a certified copy of the earlier application(s) identified above as item(s).	VI-1, VI-2, VI-3
VII-1	International Searching Authority Chosen	European Patent Office (EPO) (ISA/EP)

PCT REQUEST

Original (for SUBMISSION)

X-1	Signature of applicant, agent or common representative	
X-1 1	Name (LAST First)	OHNO, Akio
X-1 2	Name of signatory	
X-1 3	Capacity	
X-2	Signature of applicant, agent or common representative	
X-2 1	Name (LAST, First)	HARADA, Yasuo
X-2 2	Name of signatory	
X-2 3	Capacity	
X-3	Signature of applicant, agent or common representative	
X-3 1	Name (LAST First)	KINPARA, Reiko
X-3 2	Name of signatory	
X-3 3	Capacity	
X-4	Signature of applicant, agent or common representative	
X-4 1	Name (LAST First)	ECHIGO, Tomoki
X-4 2	Name of signatory	
X-4 3	Capacity	

FOR RECEIVING OFFICE USE ONLY

10-1	Date of actual receipt of the purported international application	
10-2	Drawings	
10-2 1	Received	
10-2 2	Not received	
10-3	Corrected date of actual receipt due to later but timely received papers or drawings completing the purported international application	
10-4	Date of timely receipt of the required corrections under PCT Article 11(2)	
10-5	International Searching Authority	ISA/EP
10-6	Transmittal of search copy delayed until search fee is paid	

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No.

PCT/JP2004/004134

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER IPC 7 C08F216/20 C08F222/06 C08F8/12 C08F8/32 C08G65/332 A61K47/48 A61K38/16		
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) IPC 7 C08F C08G A61K		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used) EPO-Internal, MPI Data, PAJ		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Classification of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	PATENT ABSTRACTS OF JAPAN vol 0186, no 10 (C-1276), 21 November 1994 (1994-11-21) & JP 6 233679 A (KOSE CORP, others 01), 23 August 1994 (1994-08-23) cited in the application abstract	1-132
A	PATENT ABSTRACTS OF JAPAN vol 0185, no 62 (C-1265), 27 October 1994 (1994-10-27) & JP 6 206675 A (NIPPON OIL & FATS CO LTD), 26 July 1994 (1994-07-26) cited in the application abstract	1-132
-/-		
☒ Further documents are listed in the continuation of box C.		
☒ Patent family members are listed in annex.		
* Special categories of cited documents A document claiming the general state of the art which is not considered to be of particular relevance *E* earlier document but published on or after the international filing date L document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) O* document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means *P* document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed *T* later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention *X* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone *Y* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art. *Z* document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search 24 June 2004		Date of mailing of the international search report 02/07/2004
Name and mailing address of the ISA European Patent Office, P.O. Box 5016 Patentamt 2 NL - 8200 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 840-8040, Tx. 31 691 epo of Fax (+31-70) 840-8010		Authorized officer Krail, G

309

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/J92004/004134

Box No. I Nucleotide and/or amino acid sequence(s) (Continuation of Item 1.b of the first sheet)

- 1 With regard to any nucleotide and/or amino acid sequences disclosed in the international application and necessary to the claimed invention, the international search was carried out on the basis of:
- a. type of material
- ☒ a sequence listing
- ☒ table(s) related to the sequence listing
- b. format of material
- ☐ in written format
- ☐ in computer readable form
- c. time of filing/furnishing
- ☐ contained in the international application as filed
- ☐ filed together with the international application in computer readable form
- ☐ furnished subsequently to this Authority for the purpose of search
- 2 ☐ In addition, in the case that more than one version or copy of a sequence listing and/or table relating thereto has been filed or furnished, the required statements that the information in the subsequent or additional copies is identical to that in the application as filed or does not go beyond the application as filed, as appropriate, were furnished.
3. Additional comments:

PATENT COOPERATION TREATY

PCT

3/10

INTERNATIONAL PRELIMINARY REPORT ON PATENTABILITY
(Chapter II of the Patent Cooperation Treaty)

(PCT Article 36 and Rule 70)

Applicant's or agent's file reference sankyoFP0406	FOR FURTHER ACTION See Form PCT/PEA/18	
International application No PCT/JP2004/004134	International filing date (day/month/year) 24 03 2004	Priority date (day/month/year) 24 03 2003
International Patent Classification (IPC) or national classification and IPC C08F216/20, C08F222/06, C08F8/12, C08F8/32, C08G65/332, A61K47/48, A61K38/16		
Applicant SANKYO COMPANY, LIMITED et al		
1 This report is the international preliminary examination report, established by this International Preliminary Examining Authority under Article 35 and transmitted to the applicant according to Article 36 2 This REPORT consists of a total of 5 sheets, including this cover sheet. 3 This report is also accompanied by ANNEXES comprising a ☐ sent to the applicant and to the International Bureau) a total of sheets, as follows ☐ sheets of the description claims and/or drawings which have been amended and are the basis of this report and/or sheets containing rectifications authorized by this Authority (see Rule 70 18 and Section 607 of the Administrative Instructions) ☐ sheets which supersede earlier sheets, but which this Authority considers contain an amendment that goes beyond the disclosure in the international application as filed, as indicated in item 4 of Box No. I and the Supplemental Box b ☐ (sent to the International Bureau only) a total of (indicate type and number of electronic carrier(s)) , containing a sequence listing and/or tables related thereto, in computer readable form only, as indicated in the Supplemental Box Relating to Sequence Listing (see Section 802 of the Administrative Instructions)		
4 This report contains indications relating to the following items ☒ Box No I Basis of the opinion ☐ Box No II Priority ☐ Box No III Non-establishment of opinion with regard to novelty, inventive step and industrial applicability ☐ Box No IV Lack of unity of invention ☒ Box No V Reasoned statement under Article 35(2) with regard to novelty, inventive step or industrial applicability, citations and explanations supporting such statement ☐ Box No VI Certain documents cited ☐ Box No VII Certain defects in the international application ☐ Box No VIII Certain observations on the international application		
Date of submission of the demand 03 05 2004	Date of completion of this report 22 03 2005	
Name and mailing address of the international preliminary examining authority  European Patent Office D-80299 Munich Tel +49 89 2399 0 Tx. 523858 epmu d Fax +49 89 2399 4485	Authorized Officer Krail, G Telephone No +49 89 2399-8302 	

**INTERNATIONAL PRELIMINARY REPORT
ON PATENTABILITY**

International application No
PCT/JP2004/004134

Box No V Reasoned statement under Article 35(2) with regard to novelty, inventive step or industrial applicability, citations and explanations supporting such statement

1 Statement

Novelty (N)	Yes	Claims	1-132
	No	Claims	
Inventive step (IS)	Yes	Claims	1-132
	No	Claims	
Industrial applicability (IA)	Yes	Claims	1 132
	No	Claims	

2 Citations and explanations (Rule 70 7)

see separate sheet

**INTERNATIONAL PRELIMINARY
REPORT ON PATENTABILITY
(SEPARATE SHEET)**

International application No

PCT/JP2004/004134

The remaining claims are dependent on the above claims and as such also meet the requirements of the PCT with respect to novelty and inventive step

For the assessment of claims 104-122 on the question whether they are industrially applicable, no unified criteria exist in the PCT Contracting States. The patentability can also be dependent upon the formulation of the claims. The EPO, for example, does not recognize as industrially applicable the subject-matter of claims to the use of a compound in medical treatment, but may allow, however, claims to a known compound for first use in medical treatment and the use of such a compound for the manufacture of a medicament for a new medical treatment.

As to claims 1 - 103 and 123 - 132 industrial applicability (Art 33(4) PCT) is given

Extrato de P Fols. 313



313

Expediente No		05096 785	No de Follo
Item		No de unidades	
1	CD		
2	DVD		
3	REVISTA		
4	LIBRO		
5	PERIODICO		
6	DISQUETES		
7	SOBRE DE MANILA		
8	SOBRE BLANCO TAMAÑO CARTA	X 7	✓
9	SOBRE BLANCO TAMAÑO OFICIO		
10	OTROS		
Observaciones			
contiene arte final			

ARTE FINAL



3/3

~~1/1~~

314
~~315~~

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

NIT 800176089-2

RECIBO OFICIAL DE CAJA 05 - 69,910
FECHA SEPTIEMBRE 12 DE 2005

SUPERINDUSTRIA Y CEMENTO
Indicacion 05036/05 UNIFORME
Fecha (VND): 2005-09-24/17-35.13
Folios 11
Tramite 011 PC/PATENT 379 FASE NCI 411 PRESENTAC
Dependencia 200 DIVISION DE MARCAS COMERCIALES

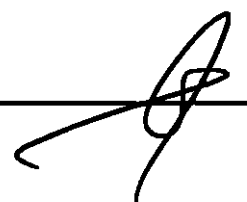
***** CONSIGNACION *****

DEPOSITANTE	TIPO PAGO	BANCO	CUENTA	No PAGO	FECHA PGO	Vr PAGO
CAVELIER ABOGADOS	CONSIGNACION	BANCO POPULAR	050-00110-6	31556010	12/09/2005	40,239,000 00

***** C O N C E P T O *****

CANT	RENTISTICO	CONCEPTO	TOTAL CONCEPTO
1	50005-01-01	SOLICITUDES	
1		TRAMITES DE SOL DE PATENTE DE IN	443,000 00
		TOTAL	\$ 443,000 00

SON CUATROCIENTOS CUARENTA Y TRES MIL PESOS

RESPONSABLE 

RECIBO DE CAJA APLICADO AL EXPEDIENTE No _____

Bo 0570-891-018-7

316
315

SUPERMINISTERIO Y COMISIÓN
Clasificación: 82056/05 820000000 Folios 315
Fecha (vicio) 2010-09-23 1/ 3:13
Formato 011 PCT-PATENT 3/9 FASE NPL1 411 PRESENTAL
Dependencia 2010 DIVISION DE NUEVAS CREACIONES

REQUISITOS NECESARIOS PARA PRESENTACION Y AGILIZACION 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 se 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 o 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 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.

Fecha:

317
316

REPUBLICA DE COLOMBIA
SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

Bogotá,
2020

Doctor(a)
FERRERO EMILIO
Apoderado(a) y/o Representante de
SANKYO COMPANY LIMITED

REFERENCIA	Radicación No	5 96785
	Solicitud internacional	JP2004/004134
	Fecha inicio fase nacional	24/10/2003
	Trámite	11
	Evento	379
	Actuación	430
	Oficio No	11092

Como resultado del examen de forma, realizado con fundamento en el artículo 38 de la Decisión 486 de la Comisión de la Comunidad Andina, artículo 27 del Tratado de Cooperación en Materia de Patentes (PCT), regla 51 bis del Reglamento y Circular Única de la Superintendencia de Industria y Comercio, se le comunica que

1 Si fuere el caso, el solicitante debe adjuntar la traducción de los anexos del reporte de examen preliminar internacional (Art 36 2 b) del tratado PCT

2 La solicitud no contiene la copia del documento en que consta la cesión del derecho a la patente del inventor al solicitante o a su causante (Art 26-k) Decisión 486

En cumplimiento de lo dispuesto por el artículo 39 de la Decisión 486, se le requiere para que dentro del término de dos 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 CESPEDES DE VERGEL
Jefe de la división de Nuevas Creaciones

El anterior requerimiento fue notificado por fijación en lista de fecha 25 Mayo 2020 adpa1

25 Nov 52
1002