

Poz. 2021.9

KÖZZÉTÉTELI
PÉLDÁNY

1. 1. 1. 1. 1. 1.

A2

OCIF-ot és poliszacharidot tartalmazó komplex

Kivonat

Egy új komplex, amely oszteoklasztogenezis inhibitoros faktort (OCIF-ot), annak analógjait vagy annak variánsait tartalmazza, és amely kötve van poliszacharidok és azok származékai közül legalább egyhez, meghosszabbodott retenciót mutat a véráramban beadás után, hasznossá téve azt csontanyagcsere-betegségek kezelésére és profilaxisára.

2003. 01. 08.

Ds.

P02021.19

11111111

KÖZZÉTETELI
PÉLDÁNY

A2

OCIF-ot és poliszacharidot tartalmazó komplex

A találmány tárgyát legalább egy oszteoklasztogenezis inhibitoros faktort (amit a leírásban ezentúl OCIF-nak nevezünk), vagy annak analógját vagy annak variánsát, és legalább egy poliszacharidot vagy annak származékát tartalmazó komplex képezi, eljárás a komplex előállítására, gyógyszer csontanyagcsere-betegségek kezelésére vagy megelőzésére, amely szerint a komplexet alkalmazzuk hatóanyagként, és a komplex alkalmazása csontanyagcsere-betegségek kezelésére vagy megelőzésére.

A csontok körülbelül az élő szervezetben jelen lévő összes kalcium 99%-át tartalmazzák, és ezáltal fontos szerepet játszanak nemcsak a test támasztásában, hanem a legnagyobb kalcium-raktározó szervként is működnek a szervezetben. A csontok fontos szerepet játszanak a kalcium homeosztázisának fenntartásában. Ismert, hogy az oszteoklasztok aktiválása, amelyek fontos szerepet játszanak a csontok reszorpciójában, a kalcium túlzott áramlását eredményezi a vérbe a csontokból, a vér kalcium homeosztázisát megbontva, ezáltal hiperkalcémiát okozva. A hiperkalcémia ezen indukálását az oszteoklasztok aktiválása és a csontok reszorpciója útján olyan citokinek okozhatják, amelyek abnormálisan szekretálódnak ráknak a csontokra történő áttér-

jedése eredményeképpen [például lásd Jean-Jacques Body, „Current and Future Directions in Medical Therapy: Hypercalcemia”, CANCER Supplement 88, 3054-3058. old. (2000)]. A rákos hiperkalcémiától szenvedő páciensek prognózisa általában gyenge, és ezáltal nagy szükség van ezen állapot hatásos kezelésének megtalálására.

Reuma estén, mint például reumatikus artritiszben és hasonlóknban, vagy oszteoartritiszben, az oszteoklasztok abnormális kialakulása vagy abnormális aktiválása ismert módon az egyik fő oka különféle tüneteknek, amelyek jelen vannak ilyen állapotoktól szenvedő páciensek csontjaiban és ízületeiben [lásd például E. Romas, M. T. Gillespie és T. J. Martin, „Involvement of Receptor Activator of NF- κ B Ligand and Tumor Necrosis Factor- α in Bone Destruction in Rheumatoid Arthritis”, Bone 30, 340-346. old. (2002)]. A reuma, mint például reumatoid artritisz és oszteoartritisz miatti csont és ízületi fájdalom rendkívül intenzív, és súlyosan rontja az ezen állapotokban szenvedő páciensek életminőségét. Ismételten, nagy szükség van ezen állapotok hatásos kezelésének megtalálására.

Az oszteoklasztok ismert módon szerepet játszanak az oszteoporózisban is. Az oszteoklasztok által kiváltott csontreszorpció és az oszteoblasztok által kiváltott csontképződés egyensúlya fokozatosan eltolódik a csontreszorpció felé a női hormonok csökkent szekréciója miatt a menopauza után, vagy az öregedés hatására, amelynek az az eredménye, hogy a csont sűrűsége csökken, és oszteoporózis alakul ki, ha a csont sűrűségének ezen csökkenése elegendően súlyos.

Amikor magas kockázatú idős páciensek csonttörést szenvednek, annak a lehetősége, hogy ágyhoz kötöttek lesznek, magas, és ez szociális problémává vált a fokozottan előregedő népesség miatt a világ minden részén [lásd például Bruno Fautrel és Francis Guillemin, „Cost of illness studies in rheumatic diseases”, *Current Opinion in Rheumatology* 14, 121-126. old. (2002)]. Tehát az osteoporózis hatásos kezelési és megelőzési módjait nagy erővel kutatják.

Ezen állapotok hagyományos kezeléseinek hormonok, mint például ösztrogén pótlását tartalmazzák, és olyan szereket alkalmazásukat, amelyek szuppresszálják az osteoklasztok aktivitását, mint például biszfoszfonátok vagy kalcitoninok [például lásd Mohammad M. Iqbal és Tanveer Sobhan, „Osteoporosis: A Review”, *Missouri Medicine*, 99, 19-23. old. (2002)]. Azonban a hormonoknak nem kívánt mellékhatásai lehetnek, mint például onkogenezis megnövekedett kockázata, endometriózis indukálása, és abnormális vérzés az ivarszervekben [például lásd Joyce Penrose White és Judith S. Schilling, „Postmenopausal Hormone Replacement: Historical Perspectives and Current Concerns”, *Clinical Excellence for Nurse Practitioners*, 4, 277-285. old. (2000)]. Habár ismert, hogy a biszfoszfonátok könnyen megkötik a felesleges kalciumot a vérben, és felhalmozódnak a csontban, egyes kutatók kétségbe vonják, hogy milyen mértékben javul ettől a csont erőssége. Ezenkívül arról is beszámoltak, hogy a vesefunkció romlásának veszélye is kapcsolódik ezek alkalmazásához [például lásd Jonathan R. Green, Yves Seltenmeyer, Knut A. Jaeggi és Leo Wildler,

„Renal Tolerability Profile of Novel, Potent Bisphosphonates in Two Short-Term Rat Model”, Pharmacology and Toxicology 80, 225-230. old. (1997)]. A kalcitonin esetében a csontsűrűség elért növekedése sajnos csak átmeneti. Arról is beszámoltak, hogy a kalcitonin alkalmazásának megszakítása a kezelt állapot regresszióját is okozhatja, míg az állati eredetű kalcitoninok hatékonysága csökkenhet hosszantartó kezelés után, az emberi szervezetben a keringésben lévő kalcitonin elleni ellenanyagok megjelenése miatt [S. L. Porcel, J. A. Cumplido, B. dela Hoz, M Cuevas és E. Losada, „Anaphylaxis to calcitonin”, Allergologia et Immunopathologia 28, 243-245. old. (2000)].

Amint fent kifejtettük, az oszteoklasztok főszerepet játszanak a csontreszorpció létrejöttében, ami fontos tényező a vér kalciumkoncentrációja növekedésének szabályozásában. Azonban úgy vélik, hogy egyik fent említett jelenlegi gyógyszernek sincs semmilyen aktivitása az oszteoklasztok kialakulásának szuppresszálsban. Ennek következtében ezen hagyományos gyógyszerek egyike sem alkalmas csontanyagcsere-betegségek alapvető kezelésére, mivel csak a tünetek kezelésére képesek, semmint az okok megszüntetésére.

Újabban az OCIF-ről demonstrálták, hogy olyan endogén fehérje, amely gátolja oszteoklaszt prekursor sejtek differenciálódását oszteoklaszttá és/vagy az érett oszteoklasztok csonreszorpciós aktivitását (lásd a WO-A-96/26217. számú nemzetközi közzétételi iratot és az EP-A-0816380. számú európai szabadalmi iratot). Az OCIF-ot más néven oszteoprotegerinnek is ismerik (lásd WO-A-97/23614. számú nemzet-

közi közzétételi iratot). Annak fényében, hogy a fent említett csontanyagcsere-betegségek, mint például hiperkalcémia, osteoporózis és reumatoid artritisz mindegyike legalább valamekkora mértékű csontreszorpciót eredményez, azt remélték, hogy ezen betegségeket sikeresen kezelhetők OCIF alkalmazásával, annak azon képessége miatt, hogy szuppresszálja maguknak az osteoklasztoknak a kialakulását és/vagy szuppresszálja az érett osteoklasztok csontreszorpciós aktivitását. Azonban az OCIF egy bázikus fehérje, amelynek az izoelektromos pontja 9 körül van, és nagyon gyorsan eltűnik beadás után a véráramból. Ezen probléma megoldására tár fel egy próbálkozást a WO-A-2000/24416. számú nemzetközi közzétételi irat és az EP-A-1127578. számú európai szabadalmi irat, ahol azt az időt, amíg az OCIF a véráramban marad a beadás után (és ily módon az OCIF hatását) megnövelték bizonyos mértékig az OCIF és poliszacharid, mint például heparin vagy dextrán-szulfát együttes beadásával. Azonban a retenciós idő elért megnyújtása nem bizonyult elegendőnek az OCIF-nak a vérben történő olyan mértékű megtartásának biztosítására, ami valódi jelelőtté tette volna azt csontanyagcsere-betegségek, mint például hiperkalcémia, osteoporózis és reuma kezelésében történő alkalmazásra. Tehát szükség van javított módszerekre az OCIF-nak a vérben való élettartamának megnyújtására a beadás után.

Tehát a találmány célja olyan OCIF-tartalmú készítmény biztosítása, amely lehetővé teszi az OCIF-nak beadás után a véráramban való élettartamának megnyújtását, ezáltal olyan

A találmány további céljai és előnyei nyilvánvalóak a részletes leírásból.

A találmány tárgya eljárás is OCIF vagy annak analógja vagy annak variánsa véráramban történő megtartási idejének megnyújtására páciensnek történő beadás után, amely szerint az OCIF, annak analógja vagy annak variánsa közül legalább egyet komplexálunk legalább egy poliszachariddal vagy annak variánsával.

A találmány tárgya eljárás is csontanyagcsere-
betegségek kezelésére vagy megelőzésére páciensben, amely

Azt találtuk, hogy az OCIF, annak analógjai és variánsai közül választott legalább egy anyagnak a poliszacharidok és azok származékai által alkotott csoportból választott legalább egy anyaggal történő inkubálásával olyan körülmények között, amelyek azt eredményezik, hogy az OCIF, annak analógjai és variánsai közül választott legalább egy anyag kötődik a poliszacharidok és azok származékai által alkotott csoportból választott legalább egy anyaghoz, olyan szer keletkezik, amelyben az OCIF-nak, annak analógjának vagy variánsának a hatása oszteoklasztok által közvetített csontanyagcsere-betegségek, mint például hiperkalcémia, oszteoporózis és reuma kezelésében vagy megelőzésében javított és megnyújtott. Ez annak a ténynek a következménye, hogy a beadás után a véráramban megtartott OCIF-nak vagy analógjának vagy variánsának az életideje megnyújtott, összehasonlítva a technika állása szerinti OCIF és poliszacharid készítményekével, amelyeket a WO-A-2000/24416. számú

Amint fent megjegyeztük, a találmány szerinti komplexek legalább egy anyagot tartalmaznak az OCIF, annak analógjai és variánsai közül, amely kötve van legalább egy anyaghoz a poliszacharidok és azok származékai által alkotott csoportból. A komplexben az OCIF és a poliszacharid kémiai kötéssel, mint például kovalens kötéssel (például Schiff-bázis képzés), ionos kötéssel vagy datív kötéssel, vagy nem kémiai kötéssel, mint például hidrofób kölcsönhatással, hidrogén-kötéssel, elektrosztatikus kölcsönhatással vagy affinitási kötéssel kapcsolódik egymáshoz.

A találmány szerint alkalmazott OCIF, annak analógja vagy annak variánsa természetes típusú lehet, vagy rekombináns típusú lehet, és a származása nem különösebben korlátozott. Természetes típusú OCIF alatt olyan OCIF-ot értünk, amelyet természetben termelt fehéréként állítunk elő, extrakcióval, tisztítással és/vagy izolálással szervből, testfolyadékból, sejttenyészetből vagy humán vagy nem humán állatból származó tenyésztő tápközegből. Rekombináns típusú OCIF, annak analógja vagy annak variánsa rekombináns fehérje, amelyet a fehérje extrakciójával, tisztításával és/vagy izolálásával állítunk elő ilyen módszerekben hagyományosan alkalmazott gazdából, mint például prokarióta gazdasejtből (például *Escherichia coli*-ből) vagy eukarióta sejtből, mint például humán vagy nem humán sejtvonalból, amely olyan vektorral lett transzformálva, amely OCIF-ot, annak analógját vagy annak variánsát kódoló polinukleotidot tartalmaz [lásd

például az EP-A-0816380. számú európai szabadalmi iratban (WO-A-96/26217. számú nemzetközi közzétételi irat) és a WO-A-97/23614. számú nemzetközi közzétételi iratban feltárt rekombináns eljárásokat].

Az OCIF-nak, analógjainak és variánsainak eredete nem különösen korlátozott, és származhatnak humán vagy nem humán állatból. Előnyösen emlősből származhatnak, mint például emberből, patkányból, egerből, nyúlból, kutyából, macskából, szarvasmarhából, sertésből, juhból vagy kecskéből; vagy madárból, mint például baromfiból, libából, csirkéből vagy pulykából. Előnyösebben emlősökből származnak, és legelőnyösebben emberből.

A találmány szerint alkalmazott OCIF vagy annak analógja lehet monomer típusú OCIF (például emberben a monomer molekulatömege SDS-PAGE-val mérve nem redukáló körülmények között körülbelül 60000), vagy dimer típusú (például emberben a dimer molekulatömege SDS-PAGE-val mérve nem redukáló körülmények között körülbelül 120000) [lásd az EP-A-0816380. számú európai szabadalmi iratot (WO-A-96/26217. számú nemzetközi közzétételi irat)].

Ismert, hogy az OCIF a sejtekben az amino-terminálison szignálpeptidet tartalmazó polipeptidként transzlálódik, és azután érik a szignálpeptid eltávolítása útján [lásd például az EP-A-0816380. számú európai szabadalmi iratban (WO-A-96/26217. számú nemzetközi közzétételi irat) és a WO-A-97/23614. számú nemzetközi közzétételi iratban feltárt rekombináns eljárásokat]. A találmány szerint alkalmazott OCIF, annak analógja vagy annak variánsa alatt mind a

szignálpeptidet tartalmazó polipeptidet, mind annak érett formáját is értjük. Előnyös példák közé tartozik az 1. azonosítószerű szekvencia -21. és +380. aminosavai közötti, szignálpeptidet tartalmazó OCIF, és az 1. azonosítószerű szekvencia +1. és +380. aminosavai közötti, szignálpeptid nélküli OCIF. Ezek közül az érett OCIF különösen előnyös.

Az is ismert, hogy metionin addícionálható az ilyen érett OCIF-ra, annak analógjára vagy annak variánsára, amikor azt rekombináns fehérjeként expresszáltatjuk gazdasejtben, különösen prokarióta gazdasejtben, mint például *Escherichia coli*-ban. Ezt úgy érjük el, hogy ATG (AUG) szekvenciájú nukleotid triplettet addícionáltatunk az OCIF-nak, analógjának vagy variánsának az érett formáját kódoló polinukleotid 5'-végére, és a kapott polinukleotidot alkalmas expressziós vektorba inzertáljuk. Az amino-terminálisán metionint tartalmazó kívánt érett fehérjét azután expresszáltatjuk alkalmas gazdasejtben, amelyet transzformáltunk a rekombináns expressziós vektorral. Ezenkívül egy vagy több aminosavat adhatunk a fehérjéhez az amino-terminális metionin mellé, további nukleotid tripletek addícionálásátával az OCIF-nak, analógjának vagy variánsának az érett formáját kódoló polinukleotid 5'-végére addícionált ATG-triplett mellé.

A találmány szerinti értelemben OCIF-analóg alatt olyan polinukleotid által kódolt fehérjét értünk, amely a természetben létezik humán vagy nem humán állat, mint például a fent említettek sejtjeiben, testfolyadékában és/vagy szerveiben. Ilyen analógok specifikus előnyös példái közé



tartozik az OCIF2, OCIF3, OCIF4 és OCIF5 [lásd az EP-A-0816380. számú európai szabadalmi iratot (WO-A-96/26217. számú nemzetközi közzétételi irat)]. Ilyen OCIF-analógokat vagy azok aktív fragmenseit például az alábbi eljárással állíthatunk elő: RNS-t extrahálunk humán vagy nem humán állat sejtjéből, szövetéből vagy testfolyadékából; az RNS-sel komplementer első cDNS-szálat szintetizálunk reverz-transzkriptáz alkalmazásával, és azután a cDNS második szálát megszintetizáljuk DNS-polimerázzal az első szálát templátként alkalmazva; az így kapott kétszálú cDNS-t alkalmas, hagyományosan alkalmazott expressziós vektorba inzertáljuk; az így kapott vektorral alkalmas, hagyományosan alkalmazott gazdasejtet transzformálunk; azután a kívánt peptidet termelő gazdára szkrínelünk hibridizációs módszerrel, mint például tarfolt-hibridizációval vagy fág-hibridizációval, OCIF-cDNS-t vagy annak fragmensét alkalmazva próbaként sztringens körülmények között [lásd az EP-A-0816380. számú európai szabadalmi iratot (WO-A-96/26217. számú nemzetközi közzétételi irat)]; és azután végezetül a kívánt OCIF-analógot expresszáltatjuk hagyományos módszerrel az így kapott gazdasejtben.

A találmány szerinti értelemben OCIF-variáns alatt olyan fehérjét értünk, amelynek olyan aminosav-szekvenciája van, amelyben egy vagy egynél több aminosav-oldallánc szubsztituálva, deletálva, addicionálva vagy inzertálva van OCIF vagy OCIF-analóg aminosav-szekvenciájában, és még mindig van legalább valamekkora OCIF-aktivitása. Ilyen OCIF-variánst például az alábbi eljárással állíthatunk elő: egy

nukleotid vagy egynél több nukleotid szubsztituálásával, deléciójával, addíciójával és/vagy inzerciójával az OCIF-ot vagy annak analógját kódoló nukleotidszekvenciában polimeráz-láncreakció alkalmazásával (amit a leírásban ezentúl PCR-nek nevezünk), genetikai rekombinációs eljárással vagy nukleázos emésztési eljárással, exonukleáz vagy endonukleáz, mint például restrikciós enzim alkalmazásával; eukarióta gazdasejt, mint például állati sejt, vagy prokarióta gazdasejt, mint például *Escherichia coli* transzformálásával olyan expressziós vektorral, amelybe a kapott, kívánt OCIF-variánst kódoló nukleotidot inzertáltuk; és azután a kívánt peptid extrakciójával, tisztításával és/vagy izolálásával a szakember számára jól ismert eljárással transzformált gazda sejttenyésztete által termelt fehérjetartalmú frakcióból.

OCIF csonkolt formáiról, amelyekben az aminosav-szekvencia jelentékeny része deletálva van az OCIF-polipeptid karboxil-terminálisáról szintén ismert, hogy megtartják az OCIF-aktivitás legalább egy részét [lásd például az EP-A-0816380. számú európai szabadalmi iratot (WO-A-96/26217. számú nemzetközi közzétételi irat) és a WO-A-97/23614. számú nemzetközi közzétételi iratot]. OCIF ilyen csonkolt típusai, amelyek megtartják a teljes OCIF-polipeptid aktivitásának legalább egy részét, szintén a találmány szerinti OCIF-variánsok közé tartoznak.

Ezenkívül ismert olyan OCIF vagy annak csonkolt variánsa, amely fuzionáltatva van immunglobulin doménhez, mint például Fc-doménhez (például olyan fúziós polipeptid, amelyben humán IgG Fc-doménje van kapcsolva OCIF karboxil-

terminálisához), és amelyek megtartják a teljes OCIF-polipeptid aktivitásának legalább egy részét (lásd WO-A-97/23614. számú nemzetközi közzétételi iratot), és ilyen fúziós fehérjék szintén a találmány szerinti OCIF-variánsok közé tartoznak.

Azt is kimutatták, hogy OCIF vagy annak analógja vagy annak variánsa kémiaailag módosítható, és még mindig hasznos aktivitású marad, és - bizonyos esetekben - előnyös tulajdonságokat mutathat, mint például megnövekedett stabilitást vagy csökkent immunogenitást. Ilyen kémiai módosítások közé tartozik módosítás csupán egyetlen helyen az OCIF-molekulában vagy annak analógjában vagy annak variánsában, vagy egynél több helyen. Például kimutatták, hogy az OCIF és annak variánsai (származékai), mint például csonkolt formája kémiaailag módosítható egy vagy több vízoldható polimerrel, mint például polietilén-glikollal, etilén-glikol/prolilén-glikol kopolimerrel, karboximetil-cellulózzal és polivinil-alkohollal, és javított biológiai aktivitást mutathat ennek eredményeképpen (lásd WO-A-97/23614. számú nemzetközi közzétételi iratot). OCIF-nak vagy analógjának vagy variánsának ilyen kémiaailag módosított típusai szintén a találmány szerinti OCIF-variánsok közé tartoznak.

A találmány szerinti komplexek előállításában alkalmazható megfelelő OCIF-variánsok példái közé tartoznak az alábbiak: OCIF-C19S, OCIF-C20S, OCIF-C21S, OCIF-C22S, OCIF-C23S, OCIF-DCR1, OCIF-DCR2, OCIF-DCR3, OCIF-DCR4, OCIF-DDD1, OCIF-DDD2, OCIF-CL, OCIF-CC, OCIF-CDD2, OCIF-CDD1, OCIF-CCR4, OCIF-CCR3, OCIF-CBst, OCIF-CSph, OCIF-CBsp,

OCIF-CPst [lásd az EP-A-0816380. számú európai szabadalmi iratot (WO-A-96/26217. számú nemzetközi közzétételi irat)], muOPG[22-401]-Fc, muOPG[22-194]-Fc, muOPG[22-185]-Fc, muOPG[22-180]-Fc, muOPG[22-401], muOPG[22-401]C195, muOPG[22-401]C202, muOPG[22-401]C277, muOPG[22-401]C319, muOPG[22-401]C400, muOPG[22-185], muOPG[22-194], muOPG[22-200], muOPG[22-212], muOPG[22-293], muOPG[22-355], huOPG[22-401]-Fc, huOPG[22-201]-Fc, huOPG[22-401]-Fc P26A, huOPG[22-401]-Fc Y28F, huOPG[22-401], huOPG[27-401]-Fc, huOPG[29-401]-Fc, huOPG[32-401]-Fc, muOPG met[22-194], muOPG met[22-194] 5k PEG, muOPG met[22-194] 20k PEG, huOPG met[22-194]P25A, huOPG met[22-194]P25A 5k PEG, huOPG met[22-194]P25A 20k PEG, huOPG met[22-194]P25A 31k PEG, huOPG met[22-194]P25A 57k PEG, huOPG met[22-194]P25A 12k PEG, huOPG met[22-194]P25A 20k elágazó PEG, huOPG met[22-194]P25A 8k PEG dimer, huOPG met[22-194] P25A diszulfid keresztköötött (WO-A-97/23614. számú nemzetközi közzétételi irat), OPG[22-194]-Fc, OPG[22-201]-Fc, OPG[22-194]-Fc Δ C, OPG[22-201]-Fc Δ C, OPG[22-194]-FcG₁₀, metFc Δ C-OPG[22-194] (WO-A-2001/17543), OPG[22-194]-Fc Δ C, OPG[22-194]-FcG₁₀, Fc Δ C-OPG[22-194], metFc Δ C-OPG[22-194], metFc Δ C-22-194, OPG[22-194]-Fc, OPG[22-194]-Fc Δ C, metOPG[22-194], metOPG[22-201], OPG[22-293], OPG[22-401] és metFc Δ C-22-194 (WO-A-2001/18203. számú nemzetközi közzétételi irat).

Ezek közül előnyös példái közé tartoznak az alábbiak: OCIF-C19S, OCIF-C20S, OCIF-C21S, OCIF-C22S, OCIF-C23S, OCIF-DCR1, OCIF-DCR2, OCIF-DCR3, OCIF-DCR4, OCIF-DDD1, OCIF-DDD2, OCIF-CL, OCIF-CC, OCIF-CDD2, OCIF-CDD1, OCIF-

CCR4, OCIF-CCR3, OCIF-CBst, OCIF-CSph, OCIF-CBsp, OCIF-CPst, muOPG[22-401]-Fc, muOPG[22-194]-Fc, muOPG[22-185]-Fc, muOPG[22-401]C195, muOPG[22-401]C202, muOPG[22-401]C319, muOPG[22-401]C400, muOPG[22-194], muOPG[22-200], muOPG[22-293], muOPG[22-355], huOPG[22-401]-Fc, huOPG[22-201]-Fc, huOPG[22-401]-Fc P26A, huOPG[22-401]-Fc Y28F, huOPG[22-401], huOPG[27-401]-Fc, huOPG[29-401]-Fc, huOPG[32-401]-Fc, muOPG met[22-194]5k PEG, muOPG met[22-194]20k PEG, huOPG met[22-194]P25A 5k PEG, huOPG met[22-194]P25A 20k PEG, huOPG met[22-194]P25A 31k PEG, huOPG met[22-194]P25A 57k PEG, huOPG met[22-194]P25A 12k PEG, huOPG met[22-194]P25A 20k elágazó PEG, huOPG met[22-194]P25A 8k PEG dimer, huOPG met[22-194]P25A diszulfid keresztkötött, OPG[22-194]-Fc, OPG[22-201]-Fc, OPG[22-194]-Fc Δ C, OPG[22-201]-Fc Δ C, OPG[22-194]-FcG₁₀, metFc Δ C-OPG[22-194], OPG[22-194]-Fc Δ C, OPG[22-194]-FcG₁₀, Fc Δ C-OPG[22-194], metFc Δ C-OPG[22-194], metFc Δ C-22-194, OPG[22-194]-Fc, OPG[22-194]-Fc Δ C, metOPG[22-194], metOPG[22-201], OPG[22-293], OPG[22-401] és metFc Δ C-22-194.

A találmány szerinti OCIF vagy annak analógja vagy annak variánsa tartalmazhat cukorláncot a molekula részeként. Bármely természetben előállított OCIF vagy annak analógja vagy rekombináns OCIF vagy annak analógja vagy annak variánsa tartalmazhat cukorláncot, amely poszttranszlációsan kapcsolódik az OCIF-hoz vagy annak analógjához vagy variánsához. Cukorláncot tartalmazó, természetben előállított OCIF vagy annak analógja előállítható sejttenyészetből, szövetekből, szervekből, testfolyadékokból, vagy humán vagy nem humán állatokból származó sejtvonalakból, hagyományos

módszerek alkalmazásával. Cukorláncot tartalmazó rekombináns OCIF vagy annak analógja vagy variánsa előállítható eukarióta gazdasejt tenyészetéből, amely a fent leírt és bemutatott bármely OCIF-ot vagy annak analógját vagy annak variánsát kódoló nukleotidszekvenciát tartalmazó vektorral van transzformálva. Alkalmazható gazdasejtek - amelyek képesek OCIF vagy annak analógja vagy variánsa poszttranszlációs módosítására oly módon, hogy cukorláncot kapcsoljanak hozzá - példái közé tartoznak kínai hörcsög petefészeksejtek és COS-sejtek [Yasuda, H. és mtsai., Endocrinology 139, 1329-1337. old. (1998)]. Ilyen cukorláncot tartalmazó OCIF vagy annak analógja vagy variánsa alkalmas találmány szerinti komplexek kialakításában történő alkalmazásra.

Másrészről, ha kívánatos olyan rekombináns OCIF-ot vagy annak analógját vagy annak variánsát előállítani, amely nem tartalmaz poszttranszlációs módosításként hozzáadott cukorláncot, akkor az előnyös gazdasejtek prokarióta sejtek, mint például *Escherichia coli*.

A találmány szerinti komplexek kialakításában alkalmazott poliszacharid polimer (glikán), amely két vagy több monoszacharid közötti glikozid-kötés eredménye, és előnyösen heteropoliszacharid (heteroglikán), amely legalább két különböző monoszacharidot tartalmaz. Bármely poliszacharid, akár természetben előforduló, akár szintetikus potenciálisan alkalmazható a találmány szerinti komplexben.

A találmány szerinti értelemben poliszacharid származéka olyan poliszacharid, amelyben a poliszacharid-molekulának legalább egy része szubsztitútálva van egy vagy egy-

nél több molekulával és/vagy oldallánccal, amely nem szacharid vagy cukor. Előnyös származékok közé tartoznak poliszacharidok savészterei, és különösen előnyösek poliszacharidok szulfát észterei.

A találmány szerinti komplexek kialakításában történő alkalmazásra megfelelő természetes poliszacharidok példái közé tartozik a hialuronsav, kondroitin-kénsav, dermatánsav, heparánsav, keratánsav, karrageenan, pektin és heparin. A találmány szerinti komplexek kialakításában történő alkalmazásra megfelelő szintetikus poliszacharidok példái közé tartozik a dextrán, míg alkalmas szintetikus poliszacharid-származékok példái közé tartozik a dextrán-szulfát. A poliszacharidok és származékaik közül a legelőnyösebb a találmány szerinti komplexek kialakításában történő alkalmazásra a dextrán-szulfát.

A találmány szerinti értelemben poliszacharidok és azok származékai, mint például dextrán-szulfát alatt értjük azok sóit is. A dextrán-szulfát legelőnyösebb sója annak nátrium sója. Dextrán-szulfát nátrium sóinak példái közé tartozik a dextrán-szulfát nátrium só kén 5 (amit a leírásban ezentúl DS5-nek nevezünk: gyártja a Meito Sangyo Co., Ltd.), és a dextrán-szulfát nátrium só 5000 és dextrán-szulfát nátrium só 10000 (mindkettőt a Wako Pure Chemical Industries, Ltd. gyártja).

A dextrán-szulfát molekulatömegét az alábbiak szerint számítjuk.

1) A dextrán molekulatömegének mérése

A dextrán molekulatömegét az alábbi Sato-féle képlettel számíthatjuk ki [például lásd „Manual for Pharmacopoeia of Japan”, 13. javított kiadás, kiad.: Hirokawashoten (1998), a dextránra vonatkozó szakasz a 40.], ami a dextrán határviszkozitásának mérésén alapul.

$$\text{Határviszkozitás} = 9,00 \times 10^{-4} \times \text{molekulatömeg}^{0,50}$$

2) Kéntartalom mérése

A jelentőséggel bíró dextrán-szulfát kéntartalmát tömegszázalékként mérhetjük bármilyen, szakterületen ismert hagyományos módszerrel, például a „Pharmacopoeia of Japan” című könyv [14. javított kiadás, kiad.: Jihou (2001)] dextrán-szulfát nátrium só kén 5-re vonatkozó szakaszában leírt eljárással.

Míg a glükóz molekulatömege, amely a dextrán alapegysége, 180, a glükóziegység valódi tömege a dextrán molekulában 162, amely a víz molekulatömegének 180-ból való kivonásának az eredménye, mivel az egymás melletti glükózegységeket α -1,6 glikozid-kötések kötik össze a dextrán-molekulában. A hidrogénatomot nátrium-szulfát csoport (SO_3Na : egy gramm-ekvivalens = 103) helyettesíti a dextrán-szulfát minden egyes glükózegységében, amely ily módon szubsztituálva van. Ezen információ felhasználásával a dextrán-szulfát molekula szubsztitúciójának mértékét (amit a leírásban ezentúl „szubsztitúciófok”-nak nevezünk) az alábbi képlettel haározhatjuk meg:

$$\text{Kéntartalom (tömeg\%)} = [32 \times \text{szubsztitúciófok} / (162 + 102 \times \text{szubsztitúciófok})] \times 100$$

3) A dextrán-szulfát molekulatömegének kiszámítása

Mivel, amint fent említettük, a dextránláncban a glükózegység aktuális molekulatömege 162, a dextrán-szulfát molekulatömegét kiszámíthatjuk ebből az információból és a 2) pontban meghatározott szubsztitúciófokból az alábbi képlet alkalmazásával:

$$\text{Dextrán-szulfát molekulatömege} = \text{dextrán molekulatömege} \times (162 + 102 \times \text{szubsztitúciófok}) / 162$$

Ismert, hogy a poliszacharidok molekulatömeg-eloszlást mutatnak, például mindegyik különböző típusú dextrán-szulfát bizonyos molekulatömeg-eloszlást mutat. A találmány szerinti komplexek kialakításában alkalmazott bármilyen poliszacharid molekulatömegét átlagos molekulatömegként adjuk meg. A találmány szerint alkalmazott poliszacharidok átlagos molekulatömege nem korlátozott semmilyen mértékben sem. A találmány szerinti legelőnyösebb poliszacharid-származék, a dextrán-szulfát átlagos molekulatömege általában 1500-12000, és előnyösebben 1800-6000. A DS5 molekulatömege (átlag $\pm$ szórás) körülbelül 1950 ± 70 ($n = 7$). A DS5 kén-szubsztitúciófoka (átlag $\pm$ szórás) - a fenti módon számítva - körülbelül $0,32 \pm 0,01$ ($n = 7$). A dextrán-szulfát nátrium só 5000 és dextrán-szulfát nátrium só 10000 átlagos molekulatömege körülbelül sorrendben 5000 és 10000. A találmány

szerinti komplexek kialakításában alkalmazott poliszacharidokat alkalmazhatjuk bármilyen további tisztítással és/vagy frakcionálással vagy anélkül az alkalmazás előtt. A találmány szerinti értelemben poliszacharidok vagy azok származékai nem tartalmazznak semmilyen olyan cukorláncot, amely kapcsolódik rekombináns OCIF-hoz vagy annak analógjaihoz vagy variánsaihoz, vagy természetben előállított OCIF-hoz vagy annak analógjaihoz vagy variánsaihoz poszttranszlációsan és/vagy endogén módon humán vagy nem humán állatok sejtjeiben vagy szöveteiben vagy szervezetében.

Az OCIF-ot, annak analógjait vagy annak variánsait tartalmazó csoportból választott anyag molaránya a találmány szerinti komplexben a poliszacharidokat vagy azok származékait tartalmazó csoportból választott anyaghoz változhat különböző tényezők függvényében, beleértve a komplex komponenseit, és a körülményeket, amelyek között a komplexet létrehozzuk. Nincs különösebb korlátozás az OCIF-ot, annak analógjait vagy annak variánsait tartalmazó csoportból választott anyag és a poliszacharidokat vagy azok származékait tartalmazó csoportból választott anyag molaránya tekintetében a találmány szerinti komplexben. A találmány szerinti előnyös komplexekben, amelyek OCIF-ot, annak analógjait vagy annak variánsait tartalmazó csoportból választott anyagot és dextrán-szulfátot tartalmazznak, az OCIF-ot, annak analógjait vagy annak variánsait tartalmazó csoportból választott anyagot és dextrán-szulfát molaránya 1:1 és 1:10 között; előnyösebben a molarány 1:1 és 1:8 között; még

előnyösebben a mólarány 1:1 és 1:5 között; és legelőnyösebben a mólarány 1:1,1 és 1:4,5 között van.

Amint azt már fent említettük, az OCIF vagy annak analógja vagy variánsa létezhet monomerként vagy dimert alkotóhat, ily módon a találmány szerinti komplexben jelen lévő OCIF vagy annak analógja vagy variánsa lehet homodimer vagy heterodimer, vagy lehet homooligomer, heterooligomer, homopolimer, vagy heteropolimer, amely kettőnél több OCIF monomer egységet tartalmaz, vagy annak analógját vagy annak variánsát tartalmazza (például lásd a 6 369 027. számú amerikai egyesült államokbeli szabadalmi iratot). Az OCIF-ot, annak analógjait vagy annak variánsait tartalmazó csoportból választott anyag mólaránya a poliszacharidokat vagy azok származékait tartalmazó csoportból választott anyaghoz a találmány szerinti, OCIF-ot vagy annak analógját vagy variánsát és poliszacharidokat vagy azok származékait tartalmazó komplexben a monomer OCIF-ra vagy annak variánsára vagy annak analógjára eső poliszacharid-molekulák vagy azok származékai számaként számítjuk ki.

A találmány szerinti komplexben lévő poliszacharid vagy származéka molekuláinak számát előnyösen az alábbiak szerint határozhatjuk meg. A tesztelt komplex semlegescukor-tartalmát [amit (x)-szel jelölünk] és a csak komplexálatlan, szabad OCIF-ot vagy annak analógját vagy variánsát tartalmazó referenciaminta semlegescukor-tartalmát [amit (y)-nal jelölünk] fenolkénsavas módszerrel határozzuk meg (amelyet más helyen részletesen leírunk a bejelentésben). A tesztelt komplexben az OCIF-hoz, annak analógjához vagy va-

riánsához kötődő poliszacharidot vagy annak származékát (y)-nak (x)-ből való kivonásával határozzuk meg. Az így kapott értékek alkalmazásával az OCIF-hoz, vagy annak analógjához vagy variánsához kötődő poliszacharid vagy annak származékát az alábbi (I) vagy (II) pont szerint számíjuk ki:

(I) Az OCIF-hoz, vagy annak analógjához vagy variánsához kötődő poliszacharidra vagy annak származékára kapott értéket elosztjuk a poliszacharid vagy annak származéka átlagos molekulatömegével. A kapott érték jelenti a teszt komplexben lévő poliszacharid vagy annak származéka molekuláinak összes számát.

(II) Az OCIF-hoz, vagy annak analógjához vagy variánsához kötődő poliszacharidra vagy annak származékára kapott értéket elosztjuk a komplexben lévő OCIF vagy annak analógja vagy variánsa mennyiségével (mg). A kapott értéket, amely a komplexben lévő OCIF, vagy annak analógja vagy variánsa 1 mg-jára eső poliszacharid vagy annak származék amennyisége, alkalmazzuk az OCIF vagy annak analógja vagy variánsa egy molekulájára eső poliszacharid vagy annak származéka molekuláinak a számának kiszámítására, az poliszacharid vagy annak származéka átlagos molekulatömege és az OCIF vagy annak analógja vagy variánsa molekulatömege alapján [például az alábbi 4(d) példa alapján].

A találmány szerinti komplexben lévő OCIF vagy annak analógja vagy variánsa molekuláinak a számát előnyösen immunológiai vizsgálati módszerrel határozzuk meg, mint például a bejelentésben más helyen leírtakkal.

A találmány szerinti komplexek egy előnyös tulajdonsága az, hogy jellemezhetők a heparinhoz való affinitásuk alapján. A heparin D-glükóزامint, D-glukuronsavat és D-iduronsavat tartalmazó poliszacharid, amely részlegesen vagy teljesen származtatva van szulfát vagy acetát csoportokkal. A találmány szerinti komplexek egy előnyös tulajdonsága, hogy az OCIF vagy annak analógja vagy variánsa heparinhoz való adszorpciójának erőssége alacsonyabb, mint a szabad, nem komplexált OCIF vagy annak analógja vagy variánsa adszorpciójának az erőssége. Az adszorpció mértékét erősen keresztkött agarózgyöngyökkel megtöltött oszloppal határozhatjuk meg, amelyekre heparin van immobilizálva (például szarvasmarha bélnyálkahártyából izolált heparin). Alkalmas ilyen típusú oszlopok közé tartozik a *HiTrap heparin HP* oszlop, a *HiPrep 16/10 heparin* és a *Heparin Sepharose* (amelyek mindegyike az Amersham Pharmacia cégtől szerezhető be). A komplex adszorpciójának (az affinitásnak) az erősségét bármely, szakember számára jól ismert, fehérjék poliszacharidokhoz való affinitásának meghatározására szolgáló megfelelő eljárás segítségével meghatározhatjuk. Előnyösen az adszorpció mértékét úgy határozhatjuk meg, hogy összehasonlítjuk a komplexnek alacsony ionerősség mellett kötődő, de az oszlopról magas ionerősség mellett eluálódó mennyiségét a komplexnek azzal a mennyiségével, amely nem kötődik a heparinoszlophoz alacsony ionerősségű körülmények között (az ionerősséget változtathatjuk erős sav sójával, mint például nátrium-kloriddal). Ezáltal a hepa-

rinnal alkotott komplex mennyiségét tipikusan az alábbi módon határozhatjuk meg:

(a) hordozóval, mint például kereszt kötött agaróz-gyöngyökkel - amelyekre heparin van immobilizálva - megtöltött oszlopot ekvilibrálnunk viszonylag alacsony ionerősségű pufferrel (például 0,1-0,8 M nátrium-kloridot tartalmazó nátrium-foszfáttal).

(b) A tesztelt találmány szerinti komplexet feloldjuk ugyanabban az alacsony ionerősségű pufferben, mint amit az (a) lépésben alkalmaztunk, és felvisszük az oszlopra, és azután egy első eluátumot gyűjtünk (A jelű frakció).

(c) Az oszlopot azután tovább mossuk ugyanazzal az alacsony ionerősségű pufferrel, mint amit az (a) lépésben alkalmaztunk, és egy második eluátumot gyűjtünk (B jelű űfrakció).

(d) Az oszlopot azután mossuk viszonylag magas ionerősségű pufferrel (például 1,0-2,0 M nátrium-kloridot tartalmazó nátrium-foszfáttal), és egy harmadik eluátumot gyűjtünk (C jelű frakció).

(e) Azután meghatározzuk az egyes frakciókban (A, B és C) jelen lévő komplex mennyiségét [sorrendben (a), (b) és (c)] (például immunológiai vizsgálati eljárással).

(f) A komplex heparinhoz való adszorpciójának a mértékét az alábbi képlettel határozzuk meg:

$$\text{adszorpció mértéke} = \frac{(c)}{(a) + (b) + (c)}$$

Minél nagyobb a komplex oszlophoz való kötődésének az erőssége, annál nagyobb (c) értéke (és csak viszonylag magas ionerősségű eluánsokkal távolítható el az oszlopról) és ezáltal magasabb az adszorpció mértéke. A találmány szerinti komplexek adszorpciójának mértéke, amelyet a fenti módon mértünk, különböző mértékben változhat, a heparinoszlop típusától és a meghatározás körülményeitől függően. Azonban a szabad, komplexálatlan OCIF adszorpciófoka mindig 1,0 körül van, míg a találmány szerinti OCIF-komplexek adszorpciófoka kisebb, mint 1,0, ezáltal demonstrálják, hogy a találmány szerinti, OCIF-ot vagy annak analógját vagy variánsát tartalmazó komplexek kötődésének erőssége heparinhoz gyengébb, mint a szabad, komplexálatlan OCIF vagy annak analógja vagy variánsa kötődésének az erőssége (például agarózgyöngyökre immobilizált sertés heparin, mint például *HiTrap HP* heparinoszlop, 0,7 M nátrium-kloridot tartalmazó 10 mM foszfát-pufferes első és második elúció, és 2,0 M nátrium-kloridot tartalmazó 10 mM foszfát-pufferes harmadik elúció alkalmazásával a találmány szerinti, OCIF-ot vagy annak analógját vagy annak variánsát tartalmazó komplexek adszorpciófoka nem nagyobb, mint 0,7, előnyösen nem nagyobb, mint 0,6 és különösen előnyösen nem nagyobb, mint 0,5.

A találmány szerinti komplexek egy másik előnyös tulajdonsága az, hogy jellemezhetők a komplexben lévő OCIF vagy annak analógja vagy variánsa immunológiai vizsgálati módszerrel (például ELISA-val) mért molekulaszámának és a komplexben lévő OCIF vagy annak analógja vagy variánsa összfehérje mérésére szolgáló módszerrel [például a Lowry-

féle eljárással: Lowry, O.H. és mtsai., J. Biol. Chem. 193, 265-275. old. (1951), abszorbancia-méréssel (λ 280 nm), ezüsfestéssel, vagy BCA eljárással] mért molekulaszámának arányával.

A komplexben lévő OCIF vagy annak analógja vagy variánsa molekulái számát immunológiai vizsgálati módszerrel, például ELISA-val határozhatjuk meg. Az ELISA-ban az immobilizált fázis kötése és a jelzőenzimmel, mint például peroxidázzal történő jelölésre szolgáló ellenanyagok bármilyen OCIF vagy annak analógja vagy variánsa elleni ellenanyagok lehetnek, amelyek megfelelnek a célra. Például a szilárd fázis kötése megfelelő ellenanyagok közé tartozik az OI-26, amelyet az OI-26 jelű ellenanyagot termelő hibridóma (FERM BP-6421) tenyészetéből tisztítunk, és az OI-19, amelyet az OI-19 jelű ellenanyagot termelő hibridóma (FERM BP-6420) tenyészetéből tisztítunk, míg a mozgó fázisban jelzőenzimmel történő jelölésre alkalmas ellenanyagok közé tartozik az OI-4 jelű anti-humán-OCIF monoklonális ellenanyag, amelyet az OI-4 jelű ellenanyagot termelő hibridóma (FERM BP-6419) tenyészetéből tisztítunk, és peroxidázzal jelölünk. Tipikus eljárás a komplexben lévő OCIF vagy annak analógja vagy variánsa molekulái számának meghatározására az alábbi:

(a) A szabad, komplexálatlan OCIF ismert koncentrációit alkalmazzuk kalibrációs görbe felvételére.

(b) ELISA-t végzünk a jelentőséggel bíró komplexszel és azután a kalibrációs görbét alkalmazzuk az OCIF koncentrációjának a meghatározására.

(c) A (b) lépésben kapott információ és az OCIF monomer molekulatömegének alkalmazásával kiszámítjuk a tesztelt komplexben lévő OCIF molekuláinak a számát.

A komplexben lévő OCIF vagy annak analógja vagy variánsa molekulái számának a komplexben lévő fehérje összmenyiségének mérésére szolgáló módszerrel történő mérését például a Lowry-féle eljárással határozhatjuk meg. Tipikus eljárás az alábbi:

(a) Szarvasmarha-szérumalbumin ismert koncentrációt alkalmazunk kalibrációs görbe felvételére.

(b) Azután alkalmazunk a Lowry-féle eljárást a tesztelendő komplexben lévő fehérje összkoncentrációjának a meghatározására, a kalibrációs görbét alkalmazva az OCIF koncentrációjának a meghatározására.

(c) A (b) lépésben kapott információ és az OCIF monomer molekulatömegének alkalmazásával kiszámítjuk a tesztelt komplexben lévő OCIF molekuláinak a számát.

Az aktuális arány változik az alkalmazott immunológiai vizsgálati eljárás típusától és/vagy az összfehérje mérésére alkalmazott módszertől függően. A találmány egy előnyös megvalósítási módja humán eredetű OCIF vagy annak analógja vagy variánsa és dextrán-szulfát komplexe, amelyben a komplexben lévő OCIF vagy annak analógja vagy variánsa molekuláinak száma enzimes immunológiai vizsgálati eljárással (ELISA-val) meghatározva - amelyben az OI-19 jelű ellenanyagot termelő hibridóma (FERM BP-6420) tenyészetéből tisztított OI-19 jelű anti-humán-OCIF monoklonális ellenanyagot alkalmazunk szilárd fázisra kötött ellenanyagként,

és OI-4 jelű ellenanyagot termelő hibridóma (FERM BP-6419) tenyészetéből tisztított OI-4 jelű anti-humán-OCIF monoklonális ellenanyagot, peroxidázzal jelölve alkalmazunk a mozgó fázisban - és a komplexben lévő OCIF vagy annak analógja vagy variánsa összfehérje mennyiségének mérésével - Lowry-féle eljárással meghatározott - molekulaszámának aránya legalább 0,5, de nem nagyobb, mint 1,2. Előnyösebben az arány legalább 0,6, de nem nagyobb, mint 1,1, és legelőnyösebben az arány legalább 0,7, de nem nagyobb, mint 1,1.

A találmány szerinti előnyös komplexek közé tartoznak az alábbiak:

(a) olyan komplex, amelyben az OCIF vagy annak analógjai vagy annak variánsai által alkotott csoportból kiválasztott anyag humán monomer OCIF, amelynek molekulatömege SDS-PAGE-val mérve nem redukáló körülmények között körülbelül 60000, vagy humán dimer OCIF, amelynek a molekulatömege SDS-PAGE-val mérve nem redukáló körülmények között körülbelül 120000, és a poliszacharid és származékai hialuronsav, kondroitin-kénsav, dermatánsav, heparánsav, keratánsav, karrageenan, pektin, heparin, dextrán vagy azok származékainak bármelyike, és az OCIF vagy annak analógjai vagy annak variánsai és a poliszacharid vagy annak származékainak molaránya 1:1 és 1:10 között van;

(b) olyan komplex, amelyben az OCIF vagy annak analógjai vagy annak variánsai által alkotott csoportból kiválasztott anyag humán monomer OCIF, amelynek molekulatömege SDS-PAGE-val mérve nem redukáló körülmények között körülbelül 60000, vagy humán dimer OCIF, amelynek a molekulatömege

SDS-PAGE-val mérve nem redukáló körülmények között körülbelül 120000, és a poliszacharid és származékai dextrán-szulfát vagy annak sói bármelyike, és az OCIF vagy annak analógjai vagy annak variánsai és a poliszacharid vagy annak származékainak mólaránya 1:1 és 1:10 között van;

(c) olyan komplex, amelyben az OCIF vagy annak analógjai vagy annak variánsai által alkotott csoportból kiválasztott anyag humán monomer vagy dimer OCIF, amelyben a monomer vagy a dimer OCIF egyik egysége tartalmazza az 1. azonosítószámú szekvencia +1. és +380. közötti aminosavait, és a poliszacharid-származék dextrán-szulfát nátrium sója, amelynek az átlagos molekulatömege 1500 és 12000 közötti, és az OCIF vagy annak analógjai vagy annak variánsai és a dextrán-szulfát nátrium sójának mólaránya 1:1 és 1:10 között van;

(d) (c) pont szerinti komplex, amelyben az OCIF vagy annak analógjai vagy annak variánsai és a dextrán-szulfát nátrium sójának mólaránya 1:1 és 1:8;

(e) (c) pont szerinti komplex, amelyben az OCIF vagy annak analógjai vagy annak variánsai és a dextrán-szulfát nátrium sójának mólaránya 1:1 és 1:5; és

(f) a (c)-(e) pontok bármelyike szerinti komplex, amelyben a poliszacharid-származék dextrán-szulfát nátrium sója, amelynek az átlagos molekulatömege 1800 és 6000 közötti.

A találmány szerinti komplexeket bármely olyan megfelelő eljárással előállíthatjuk, amely kedvez a poliszacharid vagy annak variánsának az OCIF-hoz vagy annak analógjá-

hoz vagy variánsához történő kötődésének. Egy további megvalósítási mód szerint a találmány tárgya eljárás olyan komplex előállítására, amely legalább egy anyagot tartalmaz az OCIF, annak analógjai és annak variánsai közül, ami kötve van legalább egy anyaghoz poliszacharidok és azok származékai közül, amely eljárás szerint az OCIF, annak analógjai és annak variánsai közül választott legalább egy anyagot inkubáljuk a poliszacharidok és azok származékai közül választott legalább egy anyaggal olyan körülmények között, amely kedvez komplex kialakulásának az OCIF, annak analógjai és annak variánsai közül választott legalább egy anyag és a poliszacharidok és azok származékai közül választott legalább egy anyag között.

Az OCIF, annak analógjai és annak variánsai közül választott legalább egy anyag és a poliszacharidok és azok származékai közül választott legalább egy anyag inkubálását bármilyen megfelelő körülmények között végezhetjük, de tipikusan az inkubálás vizes körülmények között történik. Előnyösen az inkubálást lúgos körülmények között végezzük. Előnyösebben az inkubálást 9,5 és 12-es pH között végezzük. Legelőnyösebben az inkubálást 10 és 11-es pH között végezzük.

Az inkubálás során az OCIF, annak analógja vagy variánsa koncentrációtartománya a vizes oldatban nem különösebben korlátozott, mindaddig, amíg az alkalmas a kívánt komplex kialakulásának lehetővé tételére. Tipikusan az OCIF, annak analógja vagy variánsa maximális koncentrációja a vizes oldatban 0,1 és 0,5 mM közötti, és a minimális koncent-

ráció 0,001 és 0,05 mM közötti. Előnyösen az OCIF, annak analógja vagy variánsa koncentrációja a vizes oldatban 0,01 és 0,2 mM közötti, és legelőnyösebben 0,05 és 0,1 mM közötti. OCIF esetében a maximális koncentráció a vizes oldatban 10 és 50 mg/ml közötti, és a minimális koncentráció 0,1 és 0,5 mg/ml közötti. Előnyösen az OCIF koncentrációja a vizes oldatban 1 és 20 mg/ml közötti, és legelőnyösebben 5 és 10 mg/ml közötti.

Az inkubálás során a poliszacharid vagy annak variánsa koncentrációtartománya a vizes oldatban nem különösebben korlátozott, mindaddig, amíg az alkalmas a kívánt komplex kialakulásának lehetővé tételére. Tipikusan a poliszacharid vagy annak származéka maximális koncentrációja a vizes oldatban 0,1 és 0,5 M közötti, és a minimális koncentráció 0,00005 és 0,05 M közötti. Előnyösen a poliszacharid vagy annak származéka maximális koncentrációja a vizes oldatban 0,005 és 0,25 M közötti, és előnyösebben 0,05 és 0,1 M közötti. Dextrán-szulfát nátrium só kén 5 esetében a poliszacharid vagy annak variánsa maximális koncentrációja a vizes oldatban 200 mg/ml és 1000 mg/ml közötti, és a minimális koncentráció 0,1 és 100 mg/ml közötti. Előnyösen a poliszacharid vagy annak variánsa koncentrációja a vizes oldatban 10 és 500 mg/ml közötti, és legelőnyösebben 100 és 200 mg/ml közötti.

Az inkubálás során a hőmérséklet nem különösebben korlátozott, mindaddig, amíg az alkalmas a kívánt komplex kialakulásának lehetővé tételére. Tipikusan az inkubálási hőmérséklet felső határa 10 és 50°C közötti, és az alsó határ

Amint fent megjegyeztük, a találmány szerinti komplex nem tartalmaz szabad poliszacharidokat vagy azok variánsait, amelyek nem kötöttek OCIF-hoz vagy annak analógjához vagy variánsához. A szabad poliszacharidok és azok variánsai eltávolítására alkalmazott eljárások nem korlátozottak, mindaddig, míg az eljárás hagyományosan alkalmazott, mint például tisztítás, izolálás és/vagy frakcionálás. Alkalmas eljárások példái közé tartozik az ioncserélő kromatográfia, adszorpciós kromatográfia, particionáló kromatográfia, gélszűrő kromatográfia, hidrofób kromatográfia, affinitási kromatográfia, kristályosítás, kisózás és ultraszűrés. Ezek közül a gélszűrő kromatográfia (amit a leírásban ezentúl „géliszűrésnek” nevezünk) és az ultraszűrés előnyösek, és a géliszűrés a legelőnyösebb.

A találmány szerinti komplexeket, amelyek legalább egy anyagot tartalmaznak az OCIF, annak analógjai vagy annak variánsai közül, kötve legalább egy anyaghoz poliszachari-

dok és azok származékai közül, különféle adatok révén, mint például izoelektromos pont, cukortartalom és immunológiai detektálás különböztethetjük meg a szabad, komplexálatlan OCIF-től vagy annak analógjától vagy variánsától.

Az izoelektromos pontot bármely, szakember számára jól ismert hagyományos izoelektromos fókuszálási módszerrel mérhetjük. Az OCIF bázikus fehérje, az izoelektromos pontja körülbelül $pI=9$. Ez szignifikánsan magasabb, mint a találmány szerinti komplexeké, amelyek OCIF-ot és poliszacharidokat és azok variánsait, mint például dextrán-szulfátot tartalmaznak, amelyek pI -je tipikusan az 5 és 7 közötti tartományban van. Tehát ezzel a módszerrel lehetséges a komplexált és komplexálatlan OCIF könnyű megkülönböztetése.

A találmány szerinti komplexek és a szabad, komplexálatlan OCIF vagy annak analógja vagy variánsa cukortartalmát mérhetjük bármilyen, semleges cukor meghatározására hagyományosan alkalmazott módszerrel, amelynek tipikus példái közé tartozik a fenolkénsavas módszer [M. Dubois és mtsai., Anal. Chem. 28, 350. old. (1956)]. Mivel a találmány szerinti, OCIF-ot vagy annak analógját vagy variánsát és poliszacharidot vagy annak variánsát tartalmazó komplex összes cukortartalma nagyobb, mint magáé az OCIF-é, azok megkülönböztethetők egymástól.

Egy további alternatív eljárás a szabad, komplexálatlan OCIF vagy annak analógja vagy variánsa megkülönböztetésére az OCIF-ot vagy annak analógját vagy variánsát poliszacharidhoz vagy annak variánsához kötve tartalmazó találmány szerinti komplexektől a poliszacharid vagy annak vari-

ánsa mennyiségének meghatározása mindegyikben olyan ellenanyag alkalmazásával, amely specifikusan kötődik a poliszacharidhoz vagy variánshoz.

Annak érdekében, hogy mérjük a fehérje mennyiségét OCIF-ban vagy annak analógjában vagy variánsában, vagy OCIF-ot vagy annak analógját vagy variánsát és poliszacharidot vagy annak variánsát tartalmazó találmány szerinti komplexben, bármely, hagyományosan az összes fehérjetartalom mérésére szolgáló eljárást alkalmazhatunk. Alkalmas példák közé tartozik a Lowry-féle eljárás [Lowry, O.H. és mtsai., J. Biol. Chem. 193, 265-275. old. (1951)], abszorbancia mérése (λ 280 nm), ezüstfestés és BCA eljárás.

Szabad, komplexálatlan OCIF vagy annak analógja vagy variánsa, vagy találmány szerinti komplexben lévő OCIF vagy annak analógja vagy variánsa mérhető immunológiai módszerrel, olyan eljárás alkalmazásával, amelyben legalább egy anti-OCIF monoklonális ellenanyagot alkalmazunk. Alkalmas anti-OCIF monoklonális ellenanyagok - amelyeket előnyösen alkalmazhatunk humán OCIF immunológiai mérésére - példái közé tartozik az OI-19 jelű hibridóma (FERM BP-6420) által termelt ellenanyag, az OI-4 jelű hibridóma (FERM BP-6419) által termelt ellenanyag és az OI-26 jelű hibridóma (FERM BP-6421) által termelt ellenanyag (például lásd a WO-A-99/15691. számú nemzetközi közzétételi iratot). Ezen ellenanyagokat sorrendben „OI-19 ellenanyag”, „OI-4 ellenanyag” és „OI-26 ellenanyag” néven nevezzük a leírásban. A OI-19 ellenanyag és az OI-4 ellenanyag mindkettő egyforma affinitással kötődik mind az OCIF monomerhez, mind az OCIF

Az OI-4 ellenanyagot termelő hibridómát belföldön helyeztük letétbe „OI-4” néven a 'National Institute of Bioscience and Human-Technology Agency of Industrial Science and Technology'-nál, amely az 1-3, Higashi 1 chome, Tsukuba-shi Ibaraki-ken 305-8566 Japan címen található (ami azóta az 'International Patent Organism Depositary, National Institute of Advanced Industrial Science and Technology' lett, amely az AIST Tsukuba Central 6, 1-1, Higashi 1-Chome Tsukuba-shi, Ibaraki-ken 305-8566 Japan cím alatt található) 1997. October 16-án (Heisei-9), és a FERM P-16473 letéti számot kapta. Azt nemzetközi letétté alakítottuk FERM BP-6419 letéti számmal 1998. július 13-án (Heisei-10).

Az OI-4 ellenanyagot termelő hibridómát belföldön helyeztük letétbe „OI-4” néven a 'National Institute of Bioscience and Human-Technology Agency of Industrial Science and Technology'-nál, amely az 1-3, Higashi 1 chome, Tsukuba-shi Ibaraki-ken 305-8566 Japan címen található (ami azóta az 'International Patent Organism Depositary, National Institute of Advanced Industrial Science and Technology' lett, amely az AIST Tsukuba Central 6, 1-1, Higashi 1-Chome Tsukuba-shi, Ibaraki-ken 305-8566 Japan cím alatt található) 1997. October 16-án (Heisei-9), és a FERM P-16473 letéti számot kapta. Azt nemzetközi letétté alakítottuk FERM BP-6419 letéti számmal 1998. július 13-án (Heisei-10).

Az OI-19 ellenanyagot termelő hibridómát belföldön helyeztük letétbe „OI-19” néven a 'National Institute of Bioscience and Human-Technology Agency of Industrial Science and Technology'-nál, amely az 1-3, Higashi 1 chome, Tsukuba-shi Ibaraki-ken 305-8566 Japan címen található (ami azóta az 'International Patent Organism Depositary, National Institute of Advanced Industrial Science and Technology' lett, amely az AIST Tsukuba Central 6, 1-1, Higashi 1-Chome Tsukuba-shi, Ibaraki-ken 305-8566 Japan cím alatt található) 1997. October 16-án (Heisei-9), és a FERM BP-16474 letéti számot kapta. Azt nemzetközi letétté alakítottuk FERM BP-6420 letéti számmal 1998. július 13-án (Heisei-10).

Az OI-26 ellenanyagot termelő hibridómát belföldön helyeztük letétbe „OI-26” néven a 'National Institute of Bioscience and Human-Technology Agency of Industrial Science and Technology'-nál, amely az 1-3, Higashi 1 chome, Tsukuba-shi Ibaraki-ken 305-8566 Japan címen található (ami azóta az 'International Patent Organism Depositary, National Institute of Advanced Industrial Science and Technology' lett, amely az AIST Tsukuba Central 6, 1-1, Higashi 1-Chome Tsukuba-shi, Ibaraki-ken 305-8566 Japan cím alatt található) 1997. October 16-án (Heisei-9), és a FERM P-16475 letéti számot kapta. Azt nemzetközi letétté alakítottuk FERM BP-6421 letéti számmal 1998. július 13-án (Heisei-10) (lásd WO-A-99/15691. számú nemzetközi közzétételi iratot).

A találmány szerinti, OCIF-ot vagy annak analógját vagy variánsát és poliszacharidot vagy annak variánsát tartalmazó komplex vérbeli vagy szérumbeli koncentrációját az alábbi módon mérhetjük. Először a komplexet beadjuk humán vagy nem humán állatnak. Azután egy meghatározott idő elteltével vért vagy szérumot veszünk le az állattól. A komplex vérbeli vagy szérumbeli koncentrációját azután ELISA-val mérjük legalább egy anti-OCIF monoklonális ellenanyag alkalmazásával, amint azt a bejelentésben máshol leírjuk (lásd WO-A-99/15691. számú nemzetközi közzétételi iratot).

A találmány szerinti komplex, amely legalább egy anyagot tartalmaz OCIF, annak analógjai és variánsai közül, amely kötve van legalább egy anyaghoz a poliszacharidok és azok származékai által alkotott csoportból, hasznos csontanyagcsere-betegségek kezelésére vagy megelőzésére. A találmány szerinti értelemben csontanyagcsere-betegség bármely olyan betegség, amelyet az attól szenvedő páciens nettó csontmennyiségének csökkenése jellemez, és amelyben szükség van a csontreszorpció és/vagy a csontreszorpció sebességének szuppresszáálására annak érdekében, hogy kezeljük vagy megelőzzük a betegséget. Csontanyagcsere-betegségek, amelyek kezelhetők vagy megelőzhetők a találmány szerinti komplexxel: elsődleges oszteoporózis (öregkori oszteoporózis, posztmenopauzális oszteoporózis és idiopátikus fiatalkori oszteoporózis); endokrin oszteoporózis (hipertiroidizmus, hypoparatiroidizmus, Cushing-féle szindróma és akromegália); hipogonadizmust kísérő oszteoporózis (hipopituitarizmus, Klinefelter-szindróma és Turner-szindróma); örök-

2

rendellenességeket kísérő oszteopénia; és egyéb oszteopénia. Csontanyagcsere-betegségek közé tartozik a szilárd karcinóma vagy csont rákos metasztázisa vagy hemológiás rosszindulatú betegség miatti leépülés is (lásd a 2000-178200. számú japán szabadalmi bejelentést).

Olyan készítmény, amely találmány szerinti, OCIF, annak analógjai vagy annak variánsai közül legalább egy anyagot poliszacharidok és azok származékai közül legalább egy anyaghoz kötve tartalmazó komplexet tartalmaz együtt gyógyászatilag elfogadható hordozóval vagy oldószerrel biztonságosan beadható orálisan vagy nem orálisan humán vagy nem humán állatnak. Az adagolási alakot megfelelően kiválaszthatjuk, és változhat különféle tényezők, mint például a kezelt betegség típusa, a betegség mértéke, a páciens kora, neme, tömege függvényében. Például a komplexet orálisan adhatjuk be tabletták, kapszulák, porok, granulátumok vagy szirupok formájában, intravénásan injektálhatjuk egyedül vagy hagyományos segédanyagokkal, mint például glükózzal, aminosavakkal vagy hasonlókkal együtt, injektálhatjuk intramuszkulárisan, szubkután, intrakután vagy intraperitoneálisan egyedül, beadhatjuk transzdermálisan borogatás formájában, beadhatjuk transznazálisan orrcsepp formájában, beadhatjuk transzmukózálsan vagy az orrüregbe nyálkahártyai felvivőszer formájában, vagy beadhatjuk intrarektálisan kúp formájában. Ezen készítményeket hagyományos módon szerelhetjük ki az orvostudomány területén általánosan alkalmazott segédanyagok alkalmazásával, mint például kötőanyagok, kötőszerek, bomlasztóanyagok, kenőanyagok, ízesítőszer-

oldódást elősegítő szerek, szuszpendálószeresek, színezékek, pH-szabályozó szerek, fertőtlenítőszeresek, gélesítő szerek, felületaktív anyagok és bevonószeresek alkalmazásával.

Amikor a találmány szerinti komplexeket tablettaként szereljük ki, bármilyen, szakterületen ismert hordozót alkalmazhatunk. A hordozók közé tartoznak például kötőanyagok, mint például laktóz, fehér cukor, nátrium-klorid, glükóz, vizelet, keményítő, kalcium-karbonát, kaolin, kristályos cellulóz, szilikát vagy hasonlók; kötőszerek, mint például víz, etanol, propanol, egyszerű szirup, glükóz-oldat, keményítő-oldat, zselatin-oldat, karboximetil-cellulóz, sellák, metil-cellulóz, kálium-foszfát, polivinil-pirrolidon vagy hasonlók; bomlasztószeresek, mint például száraz keményítő, nátrium-alginát, agar-por, laminarán-por, nátrium-hirogén-karbonát, kalcium-karbonát, polioxietylén-szorbitán zsírsavészteresek, nátrium-lauril-szulfát, sztearinsav-monoglicerid, keményítő, laktóz vagy hasonlók; bomlást gátló anyagok, mint például fehér cukor, sztearin, kakaóvaj, hidrogénzett olaj vagy hasonlók; abszorpciót gyorsító anyagok, mint például kvaterner ammónium bázisok, nátrium-lauril-szulfát vagy hasonlók; nedvesítőszeresek, mint például glicerín, keményítő vagy hasonlók; adszorbensek, mint például keményítő, laktóz, kaolin, bentonit, kolloid szilikát vagy hasonlók; és kenőanyagok, mint például finomított talkum, sztearinsav, sztearinsav fémsói, mint például kalcium-sztearát és magnézium-sztearát, talkum, bórsav-por, polietilén-glikol vagy hasonlók. Ezenfelül adott esetben a tabletták bevonatosak lehetnek, például cukorbevonatú tablet-

tát, zselatinbevonatú tablettát, enterikus bevonatú tablettát, filmbevonatú tablettát, kétrétegű tablettát vagy több-rétegű tablettát alkotva.

Amikor a találmány szerinti komplexet pirulaként szereljük ki, a készítmény tartalmazhat szakterületen ismert hordozókat, például kötőanyagokat, mint például glükózt, laktózt, kakaóvaját, keményítőport, keményített növényi olajat, kaolint, talkumot vagy hasonlókat, kötőszereket, mint például gumiarábikum port, tragakant port, zselatint, etanolt vagy hasonlókat; és bomlasztószereket, mint például laminaránt, agart vagy hasonlókat.

Amikor a találmány szerinti komplexeket kúpként szereljük ki, a készítmény tartalmazhat hagyományos hordozókat, mint például polietilénglikolt, kakaóvaját, magasabb alkoholokat, magasabb alkoholok észtereit, zselatint, félszintetikus gliceridet vagy hasonlókat.

Amikor a találmány szerinti komplexeket injekcióként szereljük ki, előnyös ha az oldat vagy szuszpenzió formájában lévő készítményt sterilizáljuk, és a vérrel izotóniássá tesszük. Amikor a készítmények oldat, emulzió vagy szuszpenzió formájában vannak, bármely, szakterületen ismert és hagyományosan alkalmazott oldószer alkalmazhatunk, amelyek példái közé tartozik a víz, etanol, propilénglikol, etoxilált izosztearil-alkohol, polyoxilált izosztearil-alkohol és polioxietilén-szorbitén zsírsav-észterek. Ezenfelül ilyen injektálható kiszerelésekben a készítmény tartalmazhat sókat, glükózt, glicerint vagy hasonlót a vérrel való izotónia fenntartására. A készítmények tartalmazhatnak to-

vábbi szereket, beleértve oldódást elősegítő anyagokat, puffereelő szereket, csillapítószeret, pH-szabályozó anyagokat, stabilizálószeret és oldódást elősegítő szereket. Az injekciókat fagyasztva-szárazíthatjuk a kiszerezés után.

A találmány szerinti készítmények további adalékanyagokat is tartalmazhatnak, mint például színezékeket, tartósítószeret, parfümöt, ízesítószeret, édesítőket vagy más gyógyszereket.

Nincs különösebb korlátozás a beadásra szolgáló a készítményben lévő, találmány szerinti, OCIF, annak analógjai vagy annak variánsai közül legalább egy anyagot és polisza-charidok és azok variánsai közül legalább egy anyagot tartalmazó komplex mennyisége tekintetében, annak érdekében, hogy csontanyagcsere-betegséget akadályozzunk meg vagy kezeljünk, de az általában 0,1 és 70 tömeg% közötti, és előnyösen 1 és 30 tömeg% közötti az egész kiszerezésre vonatkoztatva.

A találmány szerinti komplex dózisa változhat különféle tényezők függvényében, beleértve a kezelendő állapotot, a páciens korát, nemét és testtömegét, és a beadási útvonalat. Azonban a felnőtt embernek beadott mennyiség általában olyan tartományba esik, amelynek a felső határa naponta 30 és 1000 mg közötti, és az alsó határa 0,001 és 0,03 mg közötti. Az előnyös tartomány naponta 0,03 és 30 mg közötti. A beadott mennyiség általában olyan tartományba esik, amelynek a felső határa naponta 1 és 20 mg/kg közötti, és az alsó határa naponta 0,01 és 0,5 mg/kg közötti. Az előnyös tartomány naponta 0,5 mg/kg és 1 mg/kg közötti. A ta-



lálomány szerinti komplexet naponta egyszer adhatjuk be, vagy naponta egynél többször, olyan tényezőktől függően, mint például a beadás módja és a beteg állapota.

Az alábbi példákban, referenciapéldákban és teszt-példákban tovább szemléltetjük a találmányt, azonban a találmány oltalmi körét nem kívánjuk semmilyen módon a bemutatott megvalósítási módokra korlátozni.

1. példa

OCIF-ot és dextrán-szulfátot tartalmazó komplexek előállítás (I)

1(a) Rekombináns humán dimer OCIF előállítása

Rekombináns humán dimer OCIF-ot, amelynek a molekula-tömege körülbelül 120000, az EP-A-0816380. számú európai szabadalmi irat (WO-A-96/26217. számú nemzetközi közzétételi irat) példáiban leírt eljárás szerint állítottunk elő. Nevezetesen, a pBKOCIF jelű, szignálpeptidet tartalmazó humán dimer OCIF-ot kódoló nukleotidszekvenciát tartalmazó, a pBK/01F10 *E. coli* transzformáns törzsből származó plazmidvektort [amelyet FERM BP-5267 szám alatt letétbe helyeztünk a Budapesti Szerződés értelmében a 'National Institute of Bioscience and Human-Technology Agency of Industrial Science and Technology'-nál, amely az 1-3, Higashi 1 chome, Tsukuba-shi Ibaraki-ken 305-8566 Japan címen található (ami azóta az 'International Patent Organism Depositary, National Institute of Advanced Industrial Science and Technology' lett)], amelyet az EP-A-0816380. számú európai szabadalmi irat 11. példája szerint állítottunk elő, emész-

Azután az EP-A-0816380. számú európai szabadalmi irat 14. példájának eljárását alkalmaztuk a kívánt rekombináns érett humán OCIF előállítására. Nevezetesen, CHO dhFr- sejteket (ATCC, CRL 9096) transzfektáltunk a fent előállított rekombináns pSR α OCIF plazmiddal, és dihidrofolát-reduktázt (DHFR) expresszáló plazmiddal (a WO-A-92/01053. számú nemzetközi közzétételi iratban feltárt pBAdDSV plazmid), és azután a DHFR-t expresszáló transzfektánsokat kisselektáltuk. A nagy mennyiségű OCIF-ot expresszáló transzformánsokat klónoztuk. Azokat a klónokat, amelyeknek a tápközege nagy mennyiségű OCIF-ot tartalmazott kisselektáltuk, és előállítottuk a legnagyobb mennyiségű OCIF-ot expresszáló klónt, az 5561 jelűt. Az így kapott 5561-es klón egy tenyészetét kondicionáltuk és szűrtük, majd *Heparin Sepharose FF* oszlopra vittük fel (2,6 x 10 cm, Pharmacia Co.), és oszlopkromatográfiának vetettük alá lineáris nátrium-klorid

Azután az EP-A-0816380. számú európai szabadalmi irat 14. példájának eljárását alkalmaztuk a kívánt rekombináns érett humán OCIF előállítására. Nevezetesen, CHO dhFr- sejteket (ATCC, CRL 9096) transzfektáltunk a fent előállított rekombináns pSR α OCIF plazmiddal, és dihidrofolát-reduktázt (DHFR) expresszáló plazmiddal (a WO-A-92/01053. számú nemzetközi közzétételi iratban feltárt pBAdDSV plazmid), és azután a DHFR-t expresszáló transzfektánsokat kisselektáltuk. A nagy mennyiségű OCIF-ot expresszáló transzformánsokat klónoztuk. Azokat a klónokat, amelyeknek a tápközege nagy mennyiségű OCIF-ot tartalmazott kisselektáltuk, és előállítottuk a legnagyobb mennyiségű OCIF-ot expresszáló klónt, az 5561 jelűt. Az így kapott 5561-es klón egy tenyészetét kondicionáltuk és szűrtük, majd *Heparin Sepharose FF* oszlopra vittük fel (2,6 x 10 cm, Pharmacia Co.), és oszlopkromatográfiának vetettük alá lineáris nátrium-klorid

gradiens alkalmazásával. Az megközelítőleg 0,6-1,2 M nátrium-kloriddal eluált, OCIF-aktivitású frakciót azután affinitási oszlopra vittük fel (*blue-5PW*, 0,5 x 5,0 cm, Tosoh Co), és affinitási kromatográfiának vetettük alá lineáris nátrium-klorid gradiens alkalmazásával. Az eluált frakciókat SDS-poliakrilamid-gélelektroforézisnek vetettük alá redukáló és nem redukáló körülmények között, és a kívánt tisztított rekombináns humán érett OCIF-ot tartalmazó frakcióknak azokat jelöltük ki, amelyek ugyanazt a 60000 és 120000 molekulatömegű rOCIF fehérjecsíkokat tartalmazták, mint amelyeket az EP-A-0816380. számú európai szabadalmi irat 14. példájában lettek előállítva. A monomer peptid aminosav-szekvenciáját az 1. azonosítószámú szekvencián mutatjuk be, amely azonos a WO-A-96/26217. számú nemzetközi közzétételi irat és az EP-A-0816380. számú európai szabadalmi irat 4. azonosítószámú szekvenciájának teljes hosszúságú szekvenciájával vagy 5. azonosítószámú szekvenciájának 1-380. aminosavaival.

A kapott humán OCIF-ot tartalmazó kombinált frakciókat azután kiegészítettük 1/100 térfogat 25%-os trifluorecetsavval, és a kapott elegyet fordított fázisú oszlopra vittük fel (*PROTEIN-RP*, 2,0 mm x 250 mm, YMC Co.), amelyet előzetesen ekvilibráltunk 0,1% trifluorecetsavat tartalmazó 30% acetonitrillel. Az oszlopot azután 30-55% acetonitril lineáris gradiensével eluáltuk 0,2 ml/perc folyási sebesség mellett 50 percen keresztül. Két csúcsfrakciót gyűjtöttünk külön-külön, és liofilizáltuk azokat. Azt a frakciót alkalmaztuk az alábbi példákban dimer humán OCIF-ként, amely

120000 látszólagos molekulatömegű csíkot adott SDS-PAGE-n redukáló körülmények között (lásd a WO-A-96/26217. számú nemzetközi közzétételi irat és az EP-A-0816380. számú európai szabadalmi irat 17. és 18. példáját).

1(b) OCIF-ot és dextrán-szulfátot tartalmazó komplexek előállítás

A fenti 1(a) példa szerint előállított tisztított dimer humán OCIF-ot feloldottunk 0,15 M nátrium-kloridot tartalmazó 10 mM nátrium-foszfát pufferoldatban (pH 6,0), 1,5, 2, 5, 6,5, 10, 12,5, 20 vagy 50 mg/ml OCIF koncentrációra. Dextrán-szulfát nátrium só kén 5-öt (Meito Sangyo Co., Ltd., amit a leírásban ezentúl "DS5"-nek nevezünk) feloldottunk az így előállított vizes oldatban, 40, 100, 130, 150, 200, 400, 500, 510 vagy 1000 mg/ml végkoncentrációra, és azután 1 N nátrium-hidroxidot adtunk hozzá 10, 10,5 vagy 11 pH-t beállítva. A kapott vizes oldatokat inkubáltuk 4, 7, 25 vagy 37°C-on 1, 3, 6, 18, 24, 48, 72, 96, 144, 168 vagy 288 órán keresztül.

Ezen idő elteltével a kapott oldatok 4-4 ml-ét felvit-tük *Superdex 200 prep grade* gélszűrő oszlopra (az oszlop belső átmérője: 16 mm; hossza: 60 cm, kizárási molekulatömeg: 1 300 000; gyártó: Amersham Pharmacia Biotech), amelyet előzőleg ekvilibráltunk 0,3 M nátrium-kloridot tartalmazó 10 mM nátrium-foszfát pufferrel (pH 6), és azután ugyanazzal a pufferrel eluáltuk 2 ml/perc folyási sebesség mellett. Követtük az abszorpciót 280 nm-es hullámhosszon ultraibolya spektrofotométerrel, és összegyűjtöttük a 28-36

perc retenciós idejű eluátumot. A szabad DS5, amely nem kötődött az OCIF-hoz, körülbelül 50-70 perc retenciós időnél eluáélóódott. Ezen gélszűrési eljárás minden lépését szobahőmérsékleten hajtottuk végre. A kapott preparátumokat, amelyek a dimer humán OCIF és DS5 kívánt komplexeit tartalmazzák, lefagyasztottuk és -60°C -on tároltuk. Az egyes komplexek előállítás körülményeit az alábbi 1. táblázatban foglaljuk össze.

1. Táblázat

Preparátum száma	DS5 konc. (mg/ml)	OCIF konc. (mg/ml)	Hőmérséklet ($^{\circ}\text{C}$)	pH	Inkubációs idő (óra)
1	130	6,5	4	10,5	18
2	510	6,5	4	10,5	18
3	130	6,5	4	11	18
4	130	6,5	4	10,5	72
5	500	5	4	10,5	144
6	130	6,5	4	10,5	48
7	130	6,5	4	10,5	144
8	130	6,5	4	10,5	288
9	400	20	4	10,5	18
10	200	10	4	10,5	18
11	100	5	4	10,5	18
12	40	2	4	10,5	18
13	1000	12,5	4	10,5	18
14	1000	50	4	10,5	18



15	400	2	4	10,5	144
16	1000	5	4	10,5	18
17	1000	2	4	10,5	18
18	150	5	37	10,5	1
19	150	5	37	10,5	3
20	150	5	37	10,5	6
21	150	5	37	10,5	24
22	150	5	7	10,5	168
23	150	5	4	10	144
24	150	5	25	10	24
25	130	6,5	4	10,5	24
26	150	5	37	10	24
27	150	5	4	10,5	144
28	150	5	4	11	24
29	150	5	4	10,5	24
30	150	1,5	4	10,5	72
31	130	6,5	25	10,5	1
32	130	6,5	25	10,5	3
33	130	6,5	25	10,5	6
34	130	6,5	25	10,5	24
35	130	6,5	25	10,5	168
36	130	6,5	25	10,5	288
37	150	5	4	10,5	96
38	150	5	4	10,5	288
39	130	6,5	25	10,5	18
40	130	6,5	37	10,5	18

1(c) Természetes humán OCIF előállítás

Természetesen termelt humán OCIF-ot állítottunk elő a WO-A-96/26217. számú nemzetközi közzétételi irat és az EP-A-0816380. számú európai szabadalmi irat 1-4. példáiban leírt eljárás szerint IMR-90 humán magzati tüdőfibroblaszt sejtek (ATCC-CCL186) tenyészetéből.

2. példa

OCIF-ot és dextrán-szulfátot tartalmazó komplexek előállítása (II)

A fenti 1(a) példa szerint előállított tisztított dimer humán OCIF-ot feloldottunk 0,15 M nátrium-kloridot tartalmazó 10 mM nátrium-foszfát pufferoldatban (pH 6,0), 5 mg/ml OCIF koncentrációra. 5000 molekulatömegű dextrán-szulfát nátrium só (Wako Pure Chemical Industries, Ltd., amit a leírásban ezentúl "DS 5000"-nek nevezünk) oldottunk fel az így kapott vizes oldatban, 150 mg/ml DS 5000 végkoncentrációra, majd 1 N nátrium-hidroxidot adtunk hozzá, és 10,5 pH-ra állítottuk be. Az így kapott vizes oldatot 4°C-on inkubáltuk 24 órán keresztül.

Ezen idő elteltével a kapott oldat 4 ml-ét felvittük *Superdex 200 prep grade* gélszűrő oszlopkromatográfiára, amint a fenti 1(b) példában leírtuk. Követtük az abszorpciót 280 nm-es hullámhosszon ultraibolya spektrofotométerrel, és összegyűjtöttük a 28-36 perc retenciós idejű eluátumot. A szabad DS 5000, amely nem kötődött az OCIF-hoz, körülbelül 40-65 perc retenciós időnél eluálódott.

A kapott preparátumokat, amelyek a dimer humán OCIF és DS 5000 kívánt komplexeit tartalmazzák, lefagyasztottuk és -60°C -on tároltuk. A komplex előállítás körülményeit az alábbi 2. táblázatban foglaljuk össze.

2. Táblázat

Preparátum száma	DS5 konc. (mg/ml)	OCIF konc. (mg/ml)	Hőmérséklet ($^{\circ}\text{C}$)	pH	Inkubációs idő (óra)
41	150	5	4	10,5	24

3. példa

Izoelektromos pont mérése

A fenti 1(a) példában előállított rekombináns dimer humán OCIF-ot és OCIF és dextrán-szulfát fenti 1(b) példában előállított komplexét, amelyet 22. preparátumnak neveztünk az 1. táblázatban, külön-külön izoelektromos fókuszáló géltre vittük fel (*IEF PAGE mini*, pH tartomány 3-10, gyártja: Iwaki Glass), IEF pH 3-7 pufferkészlet (Technical Frontier Co.) alkalmazásával, és az alábbi feszültségeket alkalmaztuk a gélen: 100 V 1 órán keresztül, majd 200 V 1 órán keresztül és végezetül 500 V 30 percen keresztül. Az elektroforézis befejezése után az egyes esetekben kapott gélre *Coomassie Blue*-val festettük.

A fent kapott elektroforézis gélekből meghatároztuk, hogy a dimer humán OCIF izoelektriomos pontja körülbelül $\text{pI}=9$, és az OCIF és dextrán-szulfát komplexének (22. preparátum) izoelektromos pontja körülbelül $\text{pI}=6,5$, az OCIF és

az OCIF-komplex csík pozíciójának pI-markerekkel való összehasonlítása útján.

4. példa

OCIF és dextrán-szulfát molarányának mérése OCIF-ot és dextrán-szulfátot tartalmazó komplexben

4(a) Peroxidázzal jelölt OI-4 anti-humán OCIF monoklonális ellenanyag törzsoldatának előállítása

Ebben a lépésben anti-humán-OCIF monoklonális ellenanyagot jelöltünk peroxidázzal *EZ-Link Maleimide Activated Horseradish Peroxidase Kit* (Pierce) alkalmazásával, a reagenskészlethez mellékelte útmutatóban leírt II-es számú protokoll szerint. Az eljárás részletei az alábbiak voltak.

Az OI-4 jelű ellenanyagot termelő hibridóma (FERM BP-6419) tenyészetéből OI-4 jelű anti-humán-OCIF monoklonális ellenanyagot tisztítottunk az EP-A-0974671. számú európai szabadalmi irat (WO-A-99/15691. számú nemzetközi közzétételi irat) 4. példájában leírt eljárás szerint, és azután azt 1 mg/ml fehérje végkoncentrációra hígítottuk 10 mM foszfát-pufferrel (pH 7,6).

N-szukcinimidil-S-acetiltioacetátot (amelyet az *EZ-Link Maleimide Activated Horseradish Peroxidase Kit* tartalmazott) feloldottunk dimetiformamidban 10 mg/ml koncentrációra, közvetlenül a felhasználást megelőzően. Annak 4 µl-es alikvotját adtuk a fent előállított, hígított OI-4-et tartalmazó oldat 1 ml-éhez, és a kapott oldatot azután szobahőmérsékleten inkubáltuk 30 percen keresztül. Ezen idő elteltével 20 µl olyan oldatot adtunk hozzá, amelyet köz-

vetlenül a felhasználás előtt állítottunk elő 5 mg hidroxilamin-hidroklorid feloldásával 100 μ l *Maleimide Conjugation Buffer*-ben (amelyet az *EZ-Link Maleimide Activated Horseradish Peroxidase Kit* tartalmazott), és a kapott oldatot szobahőmérsékleten inkubáltuk 2 órán keresztül. Ezen idő elteltével a reakcióelegyet poliakrilamid sótlanító oszlopra (10 ml, amelyet az *EZ-Link Maleimide Activated Horseradish Peroxidase Kit* tartalmazott) vittük fel, amelyet előzőleg ekvilibráltunk 30 ml *Maleimide Conjugation Buffer*-rel (amely szintén a reagenskészlet része), és azután *Maleimide Conjugation Buffer*-t adtunk az oszlopra. Az eluátumot 0,5 ml-es frakciókba gyűjtöttük. Az ellenanyagot tartalmazó 7-10. frakciót összeöntöttük. 5 mg *EZ-Link Maleimide Activated Horseradish Peroxidase*-nak (amelyet az *EZ-Link Maleimide Activated Horseradish Peroxidase Kit* tartalmazott) 500 μ l desztillált vízben közvetlenül a felhasználás előtt történő feloldásával kapott oldat 100 μ l-ét adtuk az összeöntött eluátum-frakciókhoz, és a kapott elegyet szobahőmérsékleten inkubáltuk egy órán keresztül. Az inkubáció után azonos térfogatú glicerint adtunk az elegyhez, és az így kapott oldatot -20°C -on tároltuk.

A fenti eljárás eredményeképpen kapott oldatot alkalmaztuk peroxidázzal jelölt OI-4 anti-humán-OCIF monoklonális ellenanyag (amit a leírásban ezentúl "POD-OI-4"-nek nevezünk) törzsoldataként, amit a leírásban ezentúl "POD-OI-4 törzsoldatnak" nevezünk.

4 (b) OCIF mennyiségi meghatározása

A fenti 1. és 2. példában előállított bármelyik komplexben lévő, és az alábbi 1. referenciapéldában előállított kombinációban lévő OCIF mennyiségét enzimes immunológiai adszorpciós vizsgálati eljárással (ELISA) mértük, két anti-OCIF monoklonális ellenanyag alkalmazásával, amely eljárás részleteit az alábbiakban ismertetjük.

Az OI-26 jelű ellenanyagot termelő hibridóma (FERM BP-6421) tenyészetéből OI-26 jelű anti-humán-OCIF monoklonális ellenanyagot tisztítottunk az EP-A-0974671. számú európai szabadalmi irat (WO-A-99/15691. számú nemzetközi közzétételi irat) 4. példájában leírt eljárás szerint, és azután azt 5 µg/ml fehérje-végkoncentrációra hígítottuk 0,1 M nátrium-hidrogén-karbonáttal. Az oldat 100 µl-es alikvotját 96-mérőhelyes mikrotiterlemez (Maxisorp, NUNC) mérőhelyeire adtuk, és a lemezt azután leragasztottuk, és 4°C-on inkubáltuk éjszakán keresztül. Ezen idő elteltével minden mérőhelyet 3-szor mostunk 250 µl foszfát pufferelt sóoldattal (PBS) (pH 7,4), amely 0,1% poliszorbát-20-at tartalmazott. 20 µl hígító pufferoldatot [amely 0,2 M Trisz-sósavat, 40% Block Ace-t (Dainippon Pharmaceutical Co., Ltd.), és 0,1% poliszorbát-20-at tartalmazott; pH 7,4] adtunk minden egyes mérőhelyhez, és azután a lemezt szobahőmérsékleten tartottuk 20 percen keresztül a mérőhelyek azon részeinek blokkolására, amelyekhez nem kötődött OI-26.

Az OI-26-ot tartalmazó mérőhelyekhez adandó fent előállított mintákat előnyösen a mérőhelyek blokkolására alkalmazott fenti hígító pufferoldattal hígítottuk. Kalibrá-

A minták mérőhelyekre történő hozzáadása után POD-OI-4 törzsoldat [a fenti 4(a) példa szerint előállítva] hígító-pufferrel [0,2 M Trisz-sósav, 40% Block Ace (Dainippon Pharmaceutical Co., Ltd.), 0,1% poliszorbát-20-; pH 7,4] 1500-szorosra hígított oldatának 50 µl-ét adtuk a mérőhelyekhez, és azután a mikrotiterlemezt szobahőmérsékleten inkubáltuk 2 órán keresztül. Ezen idő elteltével minden mérőhelyet 4-szor mostunk 250 µl, 0,1% poliszorbát-20-at tartalmazó foszfát pufferrel (pH 7,4, amit a leírásban ezentúl "PB"-nek nevezünk).

0,1 M citromsavat és 0,2 M dinátrium-hidrogén-foszfátot összekevertünk, és ezt alkalmaztuk szubsztrátoldatként (pH 4,5). Ennek 32,5 ml-es alikvotját átvittük kémcsőbe, és 6,5 µl hidrogén-peroxidot adtunk hozzá. 13 mg-os o-feniléndiamin-dihidroklorid (OPD) tablettát (Wako Pure Chemical Industries, Ltd.) oldottunk fel azután a kapott oldatban. Ennek 100 µl-es alikvotját adtuk minden egyes mérőhelyhez, a lemezt letakartuk alufóliával, és azután szobahőmérsékleten inkubáltuk 15 percen keresztül. Ezen idő elteltével 50 µl reakciót leállító oldatot adtunk minden egyes mérőhelyhez, amely tisztított vizet és tömény kénsavat tartalmazott 250:50 térfogatarányban. Miután a mérőhelyekben lévő oldatokat óvatosan megkevertük rázógéppel (*Titer mixer MB-1*: Japan Trika), az egyes mérőhelyek abszorbanciáját mértük

490 nm-es hullámhosszon mikrotiterlemez-leolvasóval (*SPECTRA FLUOR*: TECAN).

Az ismert koncentrációjú humán OCIF standard oldatok abszorbanciájával a fenti módon készített kalibrációs görbe alapján kiszámítottuk a humán OCIF mennyiségét minden egyes mintában.

4(c) Dextrán-szulfát mennyiségi meghatározása

Az 1. és 2. példában előállított komplexek dextrán-szulfát mennyiségét semleges cukorként mértük fenolkénsavas eljárással, az alábbiak szerint.

10-60 µg/ml ismert koncentrációjú of DS5 (Meito Sangyo Co., Ltd.) vagy DS5000 (Wako Pure Chemical Industries, Ltd.) oldatot állítottunk elő hígítóoldat (0,01 M citromsav, 0,3 M nátrium-klorid, 0,01% poliszorbát-80 vizes oldata: pH 6,0) alkalmazásával, és ezeket használtuk standard oldatként. Az egyes standardok, a minta vagy a hígítóoldat 0,2 ml-ét vittük át kémcsövekbe. 0,2 ml 50 mg/ml vizes fenolt adtunk hozzájuk, és gyorsan kevertük. A kapott oldat 60°C-os vízfürdőn 20 másodpercig történő inkubálása után 1 ml tömény kénsavat adtunk azokhoz. Óvatos de gyors keverés után a csövet 10 percig inkubáltuk szobahőmérsékleten, ismét gyorsan megkevertük, majd 20 percig inkubáltuk szobahőmérsékleten. Ezen idő elteltével a csőben lévő oldat abszorbanciáját megmértük 490 nm-en spektrofotométer (UV-240: Shimadzu Seisakusho, K. K.) alkalmazásával.

Ebből az abszorbanciából és a kalibrációs görbéből meghatároztuk a semleges cukor mennyiségét. A humán OCIF cukorláncot tartalmaz. Ezért az elemzett készítményben lévő

humán OCIF-hoz kötődött dextrán-szulfát mennyiségét úgy számítottuk ki, hogy levontuk magának a humán OCIF-nak a semleges cukor-tartalmát az elemzett készítmény méréséből.

4(d) OCIF és dextrán-szulfát molarányának kiszámítása OCIF-ot és dextrán-szulfátot tartalmazó komplexben

Az elemzett készítményben lévő dextrán-szulfát mennyiségét - amint azt a fenti 4(c) példában leírt módon meghatároztuk - elosztottuk az elemzett készítményben lévő humán OCIF mennyiségével - amint azt a fenti 4(b) példában leírt módon meghatároztuk -, ezáltal megkaptuk az elemzett készítményben lévő humán OCIF 1 mg-jára eső dextrán-szulfát mennyiségét.

Az így kapott számokat alkalmaztuk azután az elemzett készítményben lévő OCIF monomer és dextrán-szulfát molarányának kiszámítására, az egy molekula OCIF monomerre jutó dextrán-szulfát molekulák számának kiszámításával, azon feltételezés alapján, hogy a humán OCIF monomer molekulatömege 60000, a DS5 molekulatömege 1950, és a DS5000 molekulatömege 5000.

A kapott eredményeket az alábbi 3. táblázatban mutatjuk be.

3. Táblázat

Preparátum	Dextrán-szulfát mennyisége a komplexben ($\mu\text{g}/\text{mg}$ OCIF)	OCIF monomer és dextrán-szulfát mólaránya a komplexben
1	48,7	1:1,5
2	100,2	1:3,1
3	39,7	1:1,2
4	62,0	1:1,9
5	136,4	1:4,3
6	60,7	1:1,9
7	58,5	1:1,8
8	60,3	1:1,9
9	67,7	1:2,1
10	94,3	1:2,9
11	63,6	1:2,0
12	60,8	1:1,9
13	144,9	1:4,5
14	116,4	1:3,6
15	126,9	1:4,0
16	145,0	1:4,5
17	116,5	1:3,6
18	46,0	1:1,4
19	61,0	1:1,9
20	68,3	1:2,1
21	110,7	1:3,4
22	100,3	1:3,1
23	65,8	1:2,1

24	58,2	1:1,8
25	43,8	1:1,4
26	80,1	1:2,5
27	61,8	1:2,0
28	57,1	1:1,8
29	69,3	1:2,2
30	77,1	1:2,4
31	34,5	1:1,1
32	53,0	1:1,7
33	47,4	1:1,5
34	62,2	1:2,0
35	96,2	1:3,0
36	122,5	1:3,9
37	67,8	1:2,1
38	69,5	1:2,4
39	78,0	1:2,5
40	98,4	1:3,1
41	161,2	1:1,9

5. példa

A kötés stabilitása OCIF és dextrán-szulfát között OCIF/dextrán-szulfát komplexekben

OCIF-ot és dextrán-szulfátot tartalmazó komplex gélszűrését kétszer megismételtük a fenti 4(c) példa szerint, és az egyes gélszűrések után kapott komplexekben lévő dextrán-szulfát mennyiségét megmértük. A részleteket az alábbiakban ismertetjük.

5(a) OCIF és dextrán-szulfát inkubálása

Az 1(b) példában fent leírt eljárást alkalmaztuk. A fenti 1(a) példa szerint előállított rekombináns dimer humán OCIF-ot feloldottunk 0,15 M nátrium-kloridot tartalmazó 10 mM nátrium-foszfát pufferben (pH 6,0), 5 mg/ml OCIF koncentrációra. DS5-öt oldottunk fel az így kapott oldatban, és így 150 mg/ml DS5 végkoncentrációt kaptunk, majd 1 N nátrium-hidroxid oldatot adtunk hozzá, és a pH-t 10,5-re állítottuk be. A kapott oldatot azután 4°C-on inkubáltuk 7 napon keresztül, humán dimer OCIF és DS5 komplexét tartalmazó oldatot előállítva.

5 (b) Első gél szűrés

A fenti 5(a) példa inkubációs idejének elteltével a humán dimer OCIF és DS5 komplexét tartalmazó oldatot gélszűrésnek vetettük alá a fenti 1(b) példában leírt eljárás szerint. A körülbelül 28-36 perces retenciós időnek megfelelő frakciókat összegyűjtöttük, míg a szabad dextránszulfát, amely nem kötődött az OCIF-hoz, 50-70 perces retenciós idő körül eluálódott.

5(c) Fehérjetartalom mérése

A komplexben lévő fehérje mennyiségét a Lowry-féle eljárással mértük [Lowry, O.H. és mtsai., J. Biol. Chem. 193, 265-275. old. (1951)], az alábbiak szerint.

0,2 g réz(II)-szulfát pentahidrátot (Wako Pure Chemical) feloldottunk vízben 50 ml végtérfogatra. 0,4 g nátrium-tartrát dihidrátot (Wako Pure Chemical) feloldottunk vízben 50 ml végtérfogatra. 20 g nátrium-karbonátot feloldottunk vízben 100 ml végtérfogatra. Az így kapott há-

Külön Folin-Ciocalteu reagenst (Wako Pure Chemical) és vizet összekevertünk 1:5 térfogatarányban közvetlenül a felhasználást megelőzően. 2,76 g citromsav trinátrium só dihidrátot (Wako Pure Chemical), 0,13 g citromsav-monohidrátot (Wako Pure Chemical), 17,5 g nátrium-kloridot és 0,1 g poliszorbát-80-at feloldottunk vízben 1 L végtérfogatban (pH 6,9), amelyet "hígítóoldatnak" nevezünk.

9,5 ml hígítóoldatot adtunk 500 µl marhaszérum-albumin (Pierce Co. Ltd.) standard oldatához, amely 2 mg/ml marhaszérum-albumint (amit „BSA”-nak nevezünk) tartalmazott 0,1%-nál kisebb koncentrációjú nátrium-azidot tartalmazó 0,9% vizes nátrium-klorid oldatban, amelyet „100 µg/ml BSA-oldatnak” nevezünk. 3,5 ml, 3 ml, 2,5 ml vagy 2 ml hígítóoldatot adtunk sorrendben 1,5 ml, 2 ml, 2,5 ml vagy 3 ml 100 µg/ml BSA-oldathoz, amelyeket sorrendben „30 µg/ml BSA-oldatnak”, „40 µg/ml BSA-oldatnak”, „50 µg/ml BSA-oldatnak” és „60 µg/ml BSA-oldatnak” nevezünk. 3 ml hígítóoldatot ad-

A meghatározandó fehérjetartalmú mintát hígítóoldattal hígítottuk, körülbelül 40 µg fehérje végkoncentrációt elérve 1 ml oldatban. 1 ml 20 µg/ml BSA-oldatot, 30 µg/ml BSA-oldatot, 40 µg/ml BSA-oldatot, 50 µg/ml BSA-oldatot, 60 µg/ml BSA-oldatot, a hígított mintát vagy a hígítóoldatot (n=3) kémcsőbe raktuk, és 1 ml lúgos rézreagenst adtunk hozzá, és a kapott oldatot összekevertük, és szobahőmérsékleten inkubáltuk 10 percen keresztül. A hígított Folin-Cicalteu reagens 0,5 ml-ét adtuk azután az oldathoz, és a kapott oldatot összekevertük, és szobahőmérsékleten inkubáltuk 30 percen keresztül. Ezen idő elteltével az egyes elegyek abszorbanciáját megmértük 10 mm-es kvarcküvetében 750 nm-es hullámhosszon ultraibolya spektrofotométerrel (*Lambda 20*: Perkin Elmer Co Ltd.). Azután kiszámítottuk a mintában lévő fehérje mennyiségét a standard BSA-oldatok abszorbanciájával felvett kalibrációs görbe alapján (BSA-mennyiségre redukált értékként).

A fenti 5(b) példa első gélszűrése után kapott komplexben lévő OCIF-hoz kötődő dextrán-szulfát mennyiségét a fenti 4(c) példában leírt eljárással mértük meg.

A fenti 5(b) példában előállított összeöntött együttes frakciót két *centriprep* egységbe vittük át (YM-30, 30,000 MW vágási érték, Millipore Amicon Co. Ltd.), és 2000 rpm-mel centrifugáltuk azokat 20 percen keresztül centrifugá-

ban(*himacCT60*, Hitachi Seisakusho Co Ltd.). A két *Centriprep* szűrőből származó átszűretlen koncentrált oldatokat összegyűjtöttük és összeöntöttük. A kapott oldatot gélszűrésnek vetettük alá a fenti 1(b) példa szerint, és a körülbelül 28-36 perces retenciós időnél jövő frakciókat összegyűjtöttük és összeöntöttük. Azután az összeöntött frakciókban lévő komplex fehérje- és cukortartalmát megmértük a fenti 5(c) és 5(d) példák szerint.

5(f) Harmadik gélszűrés

A fenti 5(e) példában előállított összeöntött együttes frakciót két *centriprep* egységbe vittük át (*YM-30*, 30,000 MW vágási érték, Millipore Amicon Co. Ltd.), és 2000 rpm-mel centrifugáltuk azokat 20 percen keresztül centrifugában(*himacCT60*, Hitachi Seisakusho Co Ltd.). A két *Centriprep* szűrőben lévő átszűretlen koncentrált oldatokat összegyűjtöttük és összeöntöttük. A kapott koncentrátumot gélszűrésnek vetettük alá a fenti 1(b) példa szerint, és a körülbelül 28-36 perces retenciós időnél jövő frakciókat összegyűjtöttük és összeöntöttük. Azután az összeöntött frakciókban lévő komplex fehérje- és cukortartalmát megmértük a fenti 5(c) és 5(d) példák szerint.

5(g) OCIF és dextrán-szulfát molarányának kiszámítása

A fenti 5(b) példa első gélszűrése, az 5(e) példa második gélszűrése és az 5(f) példa harmadik gélszűrése után kapott komplexekben lévő OCIF monomer és dextrán-szulfát molarányát a fenti 4(d) példa szerint számítottuk ki. Az kapott eredményeket az alábbi 4. táblázatban foglaljuk össze.

4. Táblázat

Gélszűrés	OCIF monomer és dextrán-szulfát mólaránya a komplexben
Első	1:2,2
Második	1:2,3
Harmadik	1:2,1

A fentiekből nyilvánvaló, hogy a találmány szerinti komplexben az OCIF és dextrán-szulfát mólaránya figyelemre-méltó módon állandó a három gélszűrés során, jelezve az OCIF és a dextrán-szulfát közötti kötés nagy stabilitását a találmány szerinti komplexekben.

6. példa

OCIF és dextrán-szulfát komplexe adszorpciójának mér-
téke kereszt kötött heparin oszlophoz

6(a) Heparin oszlopkromatográfia

Az ebben a példában szereplő összes oszlopkromatográfia-
fiás eljárást 4 ml/perc folyási sebességgel végeztük.

Heparin kereszt kötött oszlopot (*HiTrap Heparin HP* osz-
lop, Lot.289212, Amersham Pharmacia Biotech) előzetesen
ekvilibráltunk 5 ml, 0,7 M nátrium-kloridot tartalmazó 10
mM nátrium-foszfát pufferrel. Vettünk egy 1. példa 1. táb-
lázatából származó preparátumot, és 0,1 mg/ml fehérje vég-
koncentrációra hígítottuk 0,7 M nátrium-kloridot tartalmazó
10 mM nátrium-foszfát pufferrel. Az így kapott hígított ol-
dat 1 ml-ét felvittük az oszlopra, és 1 ml első eluátumot

gyűjtöttünk (A jelű frakció). Azt követően 5 ml, 0,7 M nátrium-kloridot tartalmazó 10 mM nátrium-foszfát puffert adtunk az opszlopra, és 5 ml második eluátumot gyűjtöttünk (B jelű frakció). Végezetül 4 ml, 2 M nátrium-kloridot tartalmazó 10 mM nátrium-foszfát puffert adtunk az opszlopra, és 4 ml harmadik eluátumot gyűjtöttünk (C jelű frakció).

6(b) Az OCIF mennyiségének mérése az eluátumban

100 μ l 0,1 M nátrium-hidrogén-karbonátot (pH 9,6), amelyben OI-19 anti-humán-OCIF monoklonális ellenanyagot (FERM BP-6420) oldottunk fel 10 μ g/ml koncentrációban, vittünk 96-mérőhelyes mikrotiterlemez (Maxisorp: NUNC Co Ltd.) minden mérőhelyére. A lemezt leragasztottuk, és 4°C-on inkubáltuk éjszakán keresztül. Ezen idő elteltével a mérőhelyeken lévő oldatokat dekantálással eltávolítottuk, 300 μ l Block Ace-t (Dainippon Pharmaceutical Co., Ltd.) adtunk a mérőhelyekhez, és azután a mikrotiterlemezt szobahőmérsékleten inkubáltuk 2 órán keresztül. Az oldat eltávolítása után minden mérőhelyet 3-szor mostunk 300 μ l PBS-sel (pH 7,4), amely 0,1% poliszorbát-20-at tartalmazott, SERA WASHER MW-96R (Bio Tec Co Ltd.) alkalmazásával.

A mérőhelyek fent leírt módon történő előkészítése után a fenti 6(b) példában kapott 3 eluátum (A, B és C jelű frakció) 20-20 μ l-ét 120 μ l végtérfogatra hígítottuk 0,2 M Tris-HCl-lel (pH 7,4), amely 40% Block Ace-t, 10 μ g/ml egér IgG-t és 0,1% poliszorbát-20-at tartalmazott, és azután azonos térfogatú tiszta vízzel hígítottuk. Ezzel egyidőben humán OCIF ismert mennyiségét oldottuk fel 120 μ l végtérfogatra 0,2 M Tris-HCl-lel (pH 7,4, amely 40% Block Ace-t, 10

$\mu\text{g/ml}$ egér IgG-t és 0,1% poliszorbát-20-at tartalmazott), és azután azonos térfogatú tiszta vízzel hígítottuk. Az így kapott oldatot használtuk standardként.

A hígított eluátumok és a standard mindegyikét egy-egy mérőhelyhez adtuk a fent leírt módon előkészített mikrotiterlemezen, és azután a lemezt szobahőmérsékleten inkubáltuk 2 órán keresztül óvatos keveréssel mikrotiterlemez-rázógép (NS-P: Iuchi Seiei-Do, Co Ltd.) alkalmazásával. Ezen idő elteltével az oldatot eltávolítottuk a mérőhelyekből, és azután minden mérőhelyet 6-szor mostunk 300 μl PBS-sel (pH 7,4), amely 0,1% poliszorbát-20-at tartalmazott, SERA WASHER MW-96R (Bio Tec Co. Ltd.) alkalmazásával. Azután 100 μl 0,1 M Tris-HCl-t (pH 7,4), amely 25% Block Ace-t, 10 $\mu\text{g/ml}$ egér IgG-t és 0,1% poliszorbát-20-at tartalmazott, és amelyhez a fenti 4(a) példában előállított POD-OI-4 törzsoldatot is hozzáadtuk 0,01% (V/V) koncentrációban, adtunk minden egyes mérőhelyhez, és a mikrotiterlemezt szobahőmérsékleten inkubáltuk 2 órán keresztül óvatos keveréssel ugyanazzal a mikrotiterlemez-rázógéppel. Az oldat eltávolítása után minden mérőhelyet 6-szor mostunk 300 μl PBS-sel (pH 7,4), amely 0,1% poliszorbát-20-at tartalmazott, SERA WASHER MW-96R (Bio Tec Co Ltd.) alkalmazásával.

Miután a mérőhelyeket kimostuk, 100 μl 3,3',5,5'-tetrametilbenzidin (TMB) oldható reagenst (Scytek Co Ltd.) adtunk minden egyes mérőhelyhez, és a mikrotiterlemezt szobahőmérsékleten inkubáltuk 10-15 percen keresztül óvatos keveréssel ugyanazzal a mikrotiterlemez-rázógéppel, mint fent. Ezen idő elteltével 100 μl TMB-leállító puffert

(Scytek Co Ltd.) adtunk minden mérőhelyhez. A mikrotiterlemez-rázógéppel történő körülbelül 1 perces óvatos keverés után az egyes mérőhelyek abszorbanciáját mértük 450 nm-es hullámhosszon mikrotiterlemez-leolvasó (*SPECTRA THERMO* : TECAN Co Ltd.) alkalmazásával. Azután kiszámítottuk az A, B és C jelű frakcióban lévő OCIF mennyiségét [amit (a), (b) és (c) jelöl] a fent leírt standardok abszorbanciájának a koncentráció függvényében történő ábrázolásával felvett kalibrációs görbe alapján. Az OCIF és dextrán-szulfát tesztelt komplexének abszorpciófokát a heparin-kereszt kötött oszlophoz az alábbi képlet szerint számítottuk ki:

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

Az alábbi 5. táblázatban az 1. példában előállított komplexek közül 7-nek az eredményét mutatjuk be. A komplexálatlan OCIF megfelelő eredményét is bemutatjuk. Amint a táblázatból látható, a komplexálatlan OCIF erősebben kötődött a heparin-oszlophoz, mint a találmány szerinti komplexek. Az is kiderült, hogy a találmány szerinti komplexeket tovább jellemezhetjük azok heparin-oszlopra való adszorpciójának mértékével.

5. Táblázat

Preparátum	OCIF/DS komplex adszorpciójának mértéke heparin-kereszt kötött oszlophoz
6	0,451
7	0,183
8	0,153
22	0,264
24	0,072
25	0,611
27	0,141
OCIF	0,998

7. példa

OCIF/dextrán-szulfát komplex immunológiai detektálása

7(a) Fehérje mennyiségének mérése

A fenti 1. példa preparátumában lévő komplexben lévő fehérje mennyiségét a fenti 5(c) példában leírt eljárás szerint határoztuk meg.

7(b) OCIF mennyiségének immunológiai meghatározása

A fenti 1. példa preparátumában lévő komplexben lévő OCIF mennyiségét a fenti 6. példában leírt ELISA módszerrel határoztuk meg.

7(c) Az immunológiai detekciós arány kiszámítása

A fenti 7(b) példában kapott értéket elosztottuk a fenti 7(a) példában kapott megfelelő értékkel, és az így kapott eredményt neveztük „immunológiai detekciós aránynak”.

Az kapott eredményeket az alábbi 6. táblázatban foglaljuk össze. A komplexálatlan OCIF megfelelő eredményét is bemutatjuk. Az találtuk, hogy a találmány szerinti komplexeket tovább jellemezhetjük azok immunológiai detekciós arányával.

6. Táblázat

Preparátum	OCIF/DS komplex immunológiai detekciós aránya
6	1,07
7	0,74
8	0,88
22	1,06
24	1,02
25	0,87
27	1,04
OCIF	1,06

1. referenciapélda

OCIF és dextrán-szulfát kombinációjának előállítása

OCIF és dextrán-szulfát nátrium só (5000 vagy 10000 molekulatömegű) kombinációját állítottuk elő az alábbiak szerint az EP-A-1127578. számú európai szabadalmi irat (WO-A-2000/24416. számú nemzetközi közzétételi irat) 1. példájában leírt eljárás alkalmazásával.

A fenti 1(a) példa szerint előállított, körülbelül 120000 molekulatömegű tisztított dimer humán OCIF-ot felol-

dottunk 0,15 M nátrium-kloridot és 0,01% poliszorbát-80-at tartalmazó 10 mM nátrium-foszfát pufferoldatban (pH 6,0), 0,25 mg/ml OCIF koncentrációra. A fenti 2. példában leírt DS5000-et (Wako Pure Chemical Industries, Ltd.) vagy 10000 molekulatömegű dextrán-szulfát nátrium só (Wako Pure Chemical Industries, Ltd., amit a leírásban ezentúl "DS10000"-nek nevezünk) feloldottunk a kapott vizes oldatban 1 vagy 4 mg/ml dextrán-szulfát nátrium só végkoncentrációban, és azután nátrium-hidroxidot adtunk hozzá pH 7 végső értékig. Az így kapott vizes oldatot 4°C-on inkubáltuk 24 órán keresztül az OCIF-ot és DS5000-et vagy DS10000-et tartalmazó kívánt preparátumokat előállítva, amelyeket azután az alábbi 1. tesztpéldában alkalmaztunk összehasonlítás céljára.

Az egyes kombinációk előállítási körülményeit az alábbi 7. táblázatban foglaljuk össze.

7. Táblázat

Ref. preparátum száma	Dextrán-szulfát		OCIF Konc. (mg/ml)	Hőmérséklet (°C)	pH	Inkubációs idő (óra)
	típus	Konc. (mg/ml)				
1	DS5000	4	0,25	4	7	24
2	DS10000	1	0,25	4	7	24

1. tesztpélda

OCIF-ot és dextrán-szulfátot tartalmazó komplexek szérum-koncentrációjának mérése

1(a) Injektálás és vérvétel

Öthetes Wistar nőstény patkányoktól (amelyek testtömege körülbelül 100 g) éjszakán keresztül megvontuk az élelmet. Az 1. vagy 2. példában vagy az 1. referenciapéldában előállított tesztelendő OCIF és dextrán-szulfát készítményt 0,25 mg/ml koncentrációra hígítottuk 0,01% poliszorbát-80-at tartalmazó PBS-sel (pH 7,4) injektálható oldat előállítása végett, amelyet azután beadtunk a tesztpatkányok egyikének farkába a vénán keresztül egyetlen dózisban 2 ml/testtömeg-kg injektált mennyiségben. 6 órával a beadás után vért vettünk a patkány szívéből.

1(b) A szérum frakcionálása

Miután hagytuk a fenti 1(a) lépésben összegyűjtött vért megalvadni szobahőmérsékleten 30 percig, abból szérumot állítottunk elő felülúszóként a vérnek 14000 rpm-en 3 percig történő centrifugálásával 10 cm átmérőjű rotorban.

1(c) OCIF mennyiségi meghatározás a szérumban

OI-19 anti-humán-OCIF monoklonális ellenanyag 100 µl-ét (lásd az EP-A-0816380. számú európai szabadalmi iratot, WO-A-99/15691. számú nemzetközi közzétételi irat) feloldottuk 0,1 M nátrium-hidrogén-karbonát oldatban 10 µg/ml OCIF végkoncentrációra, és ezt adtuk 96-mérőhelyes mikrotiterlemez (Maxisorp: NUNC) minden mérőhelyére, és azután a lemezt leragasztottuk, és 4°C-on hagytuk állni éjszakán keresztül. Az ellenanyag-oldatot azután dekantálással eltávolítottuk,

és 300 µl blokkoló pufferoldatot (50% *Block Ace*: Dainippon Pharmaceutical Co., Ltd.) adtunk a mérőhelyekhez, és azután a mikrotiterlemezt szobahőmérsékleten állni hagytuk 2 órán keresztül. Ezen idő elteltével minden mérőhelyet 3-szor mostunk 300 µl, 0,1% poliszorbát-20-at tartalmazó PBS-sel (pH 7,4).

100 µl tisztított vizet és 120 µl hígító pufferoldatot [összetétele: 0,2 M Tris-sósav, 40% *Block Ace* (Dainippon Pharmaceutical Co., Ltd.), 10 µg/ml egér IgG és 0,1% poliszorbát-20: pH 7,4) adtunk 20 µl tesztelendő szérumhoz, amelyet a fenti 1(b) lépésben leírt módon állítottunk elő, és összekevertük. Kontrollként 100 µl tisztított vizet és 120 µl, ismert koncentrációjú humán dimer OCIF-ot tartalmazó hígító pufferoldatot adtunk 20 µl desztillált vízhez, és összekevertük.

Az így kapott szérumpreparátumok 100 µl-ét adtuk a mérőhelyekbe, és a mikrotiterlemezt azután hagytuk szobahőmérsékleten állni 2 órán keresztül. Minden mérőhelyet 6-szor mostunk a reakció lejárta után 300 µl, 0,1% poliszorbát-20-at tartalmazó oldattal (pH 7,4). A fenti 4(a) példában előállított POD-OI-4 törzsoldat hígítóoldattal történő 1000-szeres hígításával kapott oldat 100 µl-ét [amely 0,1 M Tris-sósavat, 25% *Block Ace*-t (Dainippon Pharmaceutical Co., Ltd.), 10 µg/ml egér IgG-t és 0,1% poliszorbát-20-at tartalmazott: pH 7,4] adtunk azután a mérőhelyekhez, és a mikrotiterlemezt szobahőmérsékleten állni hagytuk 2 órán keresztül.

Ezen idő elteltével minden mérőhelyet 6-szor mostunk 300 µl, 0,1% poliszorbát-20-at tartalmazó PBS-sel (pH 7,4). 100 µl szubsztrátoldatot (TMB oldható reagens: Scytek) adtunk azután a mérőhelyekhez, és a mikrotiterlemezt szobahőmérsékleten állni hagytuk 10-15 percen keresztül. 100 µl reakciót leállító oldatot (TMB stop puffer: Scytek) adtunk azután minden mérőhelyhez.

Rázógép (*Micro plate mixer NS-P*: Iuchi Seiei-Do, Co Ltd.) alkalmazásával történő óvatos keverés után az egyes mérőhelyek abszorbanciáját mértük 450 nm-es hullámhosszon mikrotiterlemez-leolvasó (SPECTRA THERMO: TECAN) alkalmazásával. A tesztelt szérum OCIF koncentrációját azután a standard OCIF-oldatok alkalmazásával felvett kalibrációs görbéből számítottuk ki. A dózist OCIF testtömeg-kilogrammonkénti dózisaként számítottuk (mg/kg) az OCIF koncentrációjának mérésével minden fenti 1(a) lépésben előállított injekcióban, a szérumhoz hasonló módon.

1(d) Szérumkoncentráció

A fenti 1(b) pontban előállított szérumban lévő OCIF mennyiségét meghatároztuk minden egyes mintában a fenti 1(c) pontban leírt eljárás szerint. Az eredményeket az alábbi 8. táblázatban mutatjuk be.

8. Táblázat

Preparátum	Dózis (OCIF mg/kg)	Szérumkoncent- ráció (OCIF ng/ml)	Korrigált szérumkon- centráció* (OCIF ng/ml)
1	0,5	213	
2	0,5	350	
3	0,5	191	
4	0,5	370	
5	0,5	305	
6	0,5	209	
7	0,5	371	
8	0,5	571	
9	0,5	164	
10	0,5	174	
11	0,5	235	
12	0,5	249	
13	0,5	177	
14	0,5	271	
15	0,5	313	
16	0,5	359	
17	0,5	269	
18	0,6	400	351
19	0,4	526	614
20	0,4	553	760
21	0,1	132	611
22	0,6	752	651
23	0,5	340	

24	0,5	830	
25	0,5	165	
26	0,5	574	
27	0,5	584	
28	0,5	228	
29	0,5	231	
30	0,5	620	
31	0,5	338	
32	0,5	774	
33	0,5	879	
34	0,5	667	
35	0,2	318	795
36	0,1	114	570
37	0,5	535	
38	0,4	631	789
39	0,5	366	
40	0,5	423	
41	0,4	423	508
Ref. 1	0,5	75	
Ref. 2	0,5	24	

* A korrigált szérumkoncentráció az OCIF koncentrációja a szérumban, amikor az OCIF testtömeg-kg-onkénti dózisát 0,5 mg/kg-ra alakítjuk át.

Amint a 8. táblázatban bemutatjuk, a 0,5 mg/testtömeg-kg dózisban beadott találmány szerinti készítmények szérumkoncentrációja 6 órával a beadás után 2,2-11,7-szer nagyobb

volt, mint az ugyanilyen dózisban beadott 1. referencia-készítmény beadása után kapott.

Amint fent demonstráltuk, a találmány szerinti komplexek, amelyek legalább egy OCIF-ot, annak analógját vagy variánsát és legalább egy poliszacharidot vagy annak variánsát tartalmazzák, szignifikánsan magasabb koncentrációban maradnak meg a vérben beadás után, összehasonlítva OCIF-ot és poliszacharidokat tartalmazó ismert kombinációkkal, mint például a WO-A-2000/24416. számú nemzetközi közzétételi iratban feltártakkal. A találmány szerinti komplexek hasznosak különféle csontanyagcsere-betegségek, mint például osteoporózis, hiperkalcémia, csontoldó metasztázis, reumoid artritisz miatti csontvesztés, szteroidkezelés miatti osteopénia, többszörös mielóma, veseelégtelenség miatti osteopénia vagy hiperkalcémia, vese osteodisztrófia, osteoartritisz, és hasonlók megakadályozására és kezelésére.



SZEKVENCIALISTA

<210> 1
<211> 401
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<220>
<221> SIGNAL
<222> (-21)..(-1)
<223>

<220>
<221> mat_peptide
<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					
Lys	Trp	Thr	Thr	Gln	Glu	Thr	Phe	Pro	Pro	Lys	Tyr	Leu	His	Tyr	Asp
-5			-1	1				5					10		
Glu	Glu	Thr	Ser	His	Gln	Leu	Leu	Cys	Asp	Lys	Cys	Pro	Pro	Gly	Thr
			15					20					25		
Tyr	Leu	Lys	Gln	His	Cys	Thr	Ala	Lys	Trp	Lys	Thr	Val	Cys	Ala	Pro
			30					35					40		



Cys	Pro	Asp	His	Tyr	Tyr	Thr	Asp	Ser	Trp	His	Thr	Ser	Asp	Glu	Cys
45						50						55			
Leu	Tyr	Cys	Ser	Pro	Val	Cys	Lys	Glu	Leu	Gln	Tyr	Val	Lys	Gln	Glu
60					65					70				75	
Cys	Asn	Arg	Thr	His	Asn	Arg	Val	Cys	Glu	Cys	Lys	Glu	Gly	Arg	Tyr
				80					85					90	
Leu	Glu	Ile	Glu	Phe	Cys	Leu	Lys	His	Arg	Ser	Cys	Pro	Pro	Gly	Phe
			95					100					105		
Gly	Val	Val	Gln	Ala	Gly	Thr	Pro	Glu	Arg	Asn	Thr	Val	Cys	Lys	Arg
			110				115					120			
Cys	Pro	Asp	Gly	Phe	Phe	Ser	Asn	Glu	Thr	Ser	Ser	Lys	Ala	Pro	Cys
		125					130					135			
Arg	Lys	His	Thr	Asn	Cys	Ser	Val	Phe	Gly	Leu	Leu	Leu	Thr	Gln	Lys
140					145					150				155	
Gly	Asn	Ala	Thr	His	Asp	Asn	Ile	Cys	Ser	Gly	Asn	Ser	Glu	Ser	Thr
				160					165				170		
Gln	Lys	Cys	Gly	Ile	Asp	Val	Thr	Leu	Cys	Glu	Glu	Ala	Phe	Phe	Arg
			175					180					185		
Phe	Ala	Val	Pro	Thr	Lys	Phe	Thr	Pro	Asn	Trp	Leu	Ser	Val	Leu	Val
		190						195					200		
Asp	Asn	Leu	Pro	Gly	Thr	Lys	Val	Asn	Ala	Glu	Ser	Val	Glu	Arg	Ile
		205					210					215			
Lys	Arg	Gln	His	Ser	Ser	Gln	Glu	Gln	Thr	Phe	Gln	Leu	Leu	Lys	Leu
220					225					230				235	
Trp	Lys	His	Gln	Asn	Lys	Asp	Gln	Asp	Ile	Val	Lys	Lys	Ile	Ile	Gln
				240					245				250		
Asp	Ile	Asp	Leu	Cys	Glu	Asn	Ser	Val	Gln	Arg	His	Ile	Gly	His	Ala
			255						260				265		

Asn Leu Thr Phe Glu Gln Leu Arg Ser Leu Met Glu Ser Leu Pro Gly
270 275 280
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
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
Leu
380

Szabadalmi igénypontok

1. Komplex, amely legalább egy anyagot tartalmaz az oszteoklasztogenezis inhibitoros faktor (OCIF), annak analógjai és annak variánsai által alkotott csoportból, amely kötve van legalább egy anyaghoz a poliszacharidok és azok származékai által alkotott csoportból.

2. Az 1. igénypont szerinti komplex, amelyben az OCIF-ot, annak analógjait és variánsait tartalmazó csoportból választott anyag természetes típusú vagy rekombináns típusú.

3. Az 1. vagy 2. igénypont szerinti komplex, amelyben az OCIF-ot, annak analógjait és annak variánsait tartalmazó csoportból választott anyag monomer vagy dimer.

4. A 3. igénypont szerinti komplex, amelyben az OCIF-ot, annak analógjait és annak variánsait tartalmazó csoportból választott anyag humán monomer OCIF, amelynek molekulatömege SDS-PAGE-val mérve nem redukáló körülmények között körülbelül 60000, vagy humán dimer OCIF, amelynek molekulatömege körülbelül 120000 SDS-PAGE-val mérve nem redukáló körülmények között.

5. Az 1-4. igénypontok bármelyike szerinti komplex, amelyben az OCIF az 1. azonosítószámú szekvencia - 21. - +380. aminosavait tartalmazza.

6. Az 1-4. igénypontok bármelyike szerinti komplex, amelyben az OCIF az 1. azonosítószámú szekvencia +1. - +380. aminosavait tartalmazza.



7. Az 1-6. igénypontok bármelyike szerinti komplex, amelyben a poliszacharid és annak származékai a hialuronsav, kondroitin-kénsav, dermatánsav, heparánsav, keratánsav, karrageenan, pektin, heparin, dextrán vagy azok származékai bármelyike.

8. A 7. igénypont szerinti komplex, amelyben a poliszacharid-származék dextrán-szulfát vagy annak sói bármelyike.

9. A 8. igénypont szerinti komplex, amelyben a poliszacharid-származék dextrán-szulfát nátrium sója.

10. A 9. igénypont szerinti komplex, amelyben a dextrán-szulfát átlagos molekulatömege 1500-12000.

11. A 9. igénypont szerinti komplex, amelyben a dextrán-szulfát átlagos molekulatömege 1800-6000.

12. Az 1-11. igénypontok bármelyike szerinti komplex, amelyben az OCIF, annak analógjai és annak variánsai által alkotott csoportból választott anyag és a poliszacharidok és azok származékai által alkotott csoportból választott anyag molaránya 1:1 és 1:10 közötti.

13. A 12. igénypont szerinti komplex, amelyben a molarány 1:1 és 1:8 közötti.

14. Az 1-13. igénypontok bármelyike szerinti komplex, amelyben az OCIF vagy annak analógja vagy variánsa heparinhoz való adszorpciójának erőssége alacsonyabb, mint a szabad, komplexálatlan OCIF vagy annak analógja vagy variánsa adszorpciójának az erőssége.

16. Az 1-15. igénypontok bármelyike szerinti komplex, amely OCIF-ot vagy annak analógját vagy variánsát és dextrán-szulfátot vagy annak sóját tartalmazza, amelyben a

komplexben lévő OCIF vagy annak analógja vagy variánsa molekulái számának - enzimes immunológiai vizsgálati eljárással (ELISA) meghatározva, amelyben az OI-19 jelű ellenanyagot termelő hibridóma (FERM BP-6420) tenyészetéből tisztított OI-19 jelű anti-humán-OCIF monoklonális ellenanyagot alkalmazunk szilárd fázisra kötött ellenanyagként, és peroxidázzal jelölt, OI-4 jelű ellenanyagot termelő hibridóma (FERM BP-6419) tenyészetéből tisztított OI-4 jelű anti-humán-OCIF monoklonális ellenanyagot alkalmazunk a mozgó fázisban - és a komplexben lévő OCIF vagy annak analógja vagy variánsa molekulái számának - összfehérje mennyiségének Lowry-féle eljárás alkalmazásával történő mérésével meghatározva - aránya 0,5-1,2.

17. A 16. igénypont szerinti komplex, amelyben az arány 0,6-1,1.

18. A 16. igénypont szerinti komplex, amelyben az arány 0,7-1,1.

19. Az 1. igénypont szerinti komplex, amelyben az OCIF, annak analógjai vagy annak variánsai által alkotott csoportból kiválasztott anyag humán monomer OCIF, amelynek molekulatömege SDS-PAGE-val mérve nem redukáló körülmények között körülbelül 60000, vagy humán dimer OCIF, amelynek a molekulatömege SDS-PAGE-val mérve nem redukáló körülmények között körülbelül 120000, és a poliszacharid hialuronsav, kondroitin-kénsav, dermatánsav, heparánsav, keratánsav, karrageenan, pektin, heparin, dextrán vagy azok származékainak bármelyike, és az OCIF, annak analógjai vagy annak va-

riánsai és a poliszacharid vagy annak származékainak mól-
aránya 1:1 és 1:10 között van.

20. Az 1. igénypont szerinti komplex, amelyben az OCIF, annak analógjai vagy annak variánsai által alkotott csoportból kiválasztott anyag humán monomer OCIF, amelynek molekulatömege SDS-PAGE-val mérve nem redukáló körülmények között körülbelül 60000, vagy humán dimer OCIF, amelynek a molekulatömege SDS-PAGE-val mérve nem redukáló körülmények között körülbelül 120000, és a poliszacharid és származékai dextrán-szulfát vagy annak sói bármelyike, és az OCIF, annak analógjai vagy annak variánsai és a poliszacharid vagy annak származékainak mólaránya 1:1 és 1:10 között van.

21. Az 1. igénypont szerinti komplex, amelyben az OCIF, annak analógjai vagy annak variánsai által alkotott csoportból kiválasztott anyag humán monomer vagy dimer OCIF, amelyben a monomer vagy a dimer OCIF egyik egysége tartalmazza az 1. azonosítószámú szekvencia +1. és +380. közötti aminosavait, és a poliszacharid-származék dextrán-szulfát nátrium sója, amelynek az átlagos molekulatömege 1500 és 12000 közötti, és az OCIF, annak analógjai vagy annak variánsai és a dextrán-szulfát nátrium sójának mólaránya 1:1 és 1:10 között van.

22. A 21. igénypont szerinti komplex, amelyben az OCIF, annak analógjai vagy annak variánsai és a dextrán-szulfát nátrium sójának mólaránya 1:1 és 1:18 közötti.

23. A 21. igénypont szerinti komplex, amelyben az OCIF, annak analógjai vagy annak variánsai és a dextrán-szulfát nátrium sójának mólaránya 1:1 és 1:5 közötti.

24. A 21-23. igénypontok bármelyike szerinti komplex, amelyben a poliszacharid-származék dextrán-szulfát nátrium sója, amelynek az átlagos molekulatömege 1800 és 6000 közötti.

25. Eljárás OCIF vagy annak analógja vagy variánsa véráramban páciensnek történő beadás utáni megmaradásának meghosszabbításra, *azzal jellemezve*, hogy a beadást megelőzően az 1-6. igénypontok bármelyike szerinti legalább egy OCIF-ot vagy annak analógját vagy annak variánsát komplexáljuk az 1. vagy 7-11. igénypontok bármelyike szerinti poliszachariddal vagy annak származékával.

26. Gyógyászati készítmény, amely gyógyszerészeti hatóanyag hatásos mennyiségét tartalmazza hordozóval vagy oldószerrel együtt, amely gyógyszerészeti hatóanyag 1-24. igénypontok bármelyike szerinti komplex.

27. A 26. igénypont szerinti gyógyászati készítmény, csontanyagcsere-betegségek kezelésére vagy profilaxisára.

28. Az 1-24. igénypontok bármelyike szerinti komplex alkalmazása csontanyagcsere-betegségek profilaxisára vagy kezelésére alkalmas gyógyszere előállítására.

29. A 28. igénypont szerinti alkalmazás, ahol a csontanyagcsere-betegség oszteoporózis, oszteopénia, Paget-féle betegség, oszteomielitisz, csontvesztés miatti fertőző góc, hiperkalcémia, oszteoklázis, reuma miatti izületsorvadás vagy oszteopénia, oszteoarthritisz, fog körüli csont elvesztése, csont rákos metasztázisa, baleseti sérülés,

30. Eljárás az 1-24. igénypontok bármelyike szerinti komplex előállítására, azzal jellemezve, hogy az 1-6. igénypontok bármelyike szerinti, OCIF, annak analógja vagy annak variánsa által alkotott csoportból választott legalább egy anyagot inkubálunk az 1. vagy 7-11. igénypontok bármelyike szerinti, poliszacharidok és azok származékai által alkotott csoportból választott legalább egy anyaggal pH 9,5 és 12 között, és azután eltávolítjuk a szabad poliszacharidokat vagy azok származékait, amelyek nem kötődtek az OCIF-hoz, annak analógjaihoz vagy annak variánsaihoz.

32. A 30. vagy 31. igénypont szerinti eljárás, az-
zal jellemezve, hogy szabad poliszacharidokat vagy azok
származékait, amelyek nem kötődtek az OCIF-hoz, annak ana-
lógjaihoz vagy annak variánsaihoz, gélszűrési kromatográfi-
ával távolítjuk el.

33. Az 1-24. igénypontok bármelyike szerinti komplex, amely a 30-32. igénypontok bármelyike szerinti eljárások bármelyikével lett előállítva.

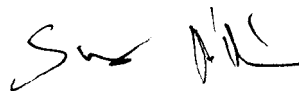
2003.01.08.

DS.

A meghatalmazott:

DANUBIA

Szabadalmi és Védjegy Iroda Kft.



Lengyel Zsolt

h.

szabadalmi ügyvivőjelölt