

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 387 379**

51 Int. Cl.:
C07K 14/435 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 96 Número de solicitud europea: **10755307 .5**
96 Fecha de presentación: **17.09.2010**
97 Número de publicación de la solicitud: **2352750**
97 Fecha de publicación de la solicitud: **10.08.2011**

54 Título: **Tampones para controlar el pH de las proteínas morfogenéticas óseas**

30 Prioridad:
17.09.2009 US 243383 P

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
21.09.2012

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
21.09.2012

73 Titular/es:
Stryker Corporation
2825 Airview Boulevard
Kalamazoo, MI 49002, US

72 Inventor/es:
HILE, David y
STROHMEIER, Gregg

74 Agente/Representante:
Curell Aguilá, Mireia

ES 2 387 379 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín europeo de patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Tampones para controlar el pH de las proteínas morfogenéticas óseas.

5 **Referencia cruzada con las solicitudes relacionadas**

La presente solicitud reivindica prioridad y los derechos de la solicitud de patente provisional US nº 61/243.383, presentada el 17 de septiembre 2009, cuyos contenidos se incorporan como referencia en la presente memoria.

10 **Campo técnico de la invención**

La presente invención se refiere a composiciones para estabilizar el pH de composiciones de proteínas morfogenéticas óseas.

15 **Antecedentes**

La estabilidad de las soluciones y las formulaciones liofilizadas de proteínas con nudo de cisteína y las proteínas de la superfamilia TGF-beta, que incluye la familia de proteínas morfogenéticas óseas (BMP), depende del pH de la formulación. Estas proteínas son básicas y, cuando se añaden a un tampón neutro, aumenta el pH. La adición de bajas concentraciones de estas proteínas no afecta significativamente el pH resultante de la formulación. Sin embargo, a medida que aumenta la concentración de estas proteínas en la formulación, aumenta el pH de la formulación, con lo que se reduce la estabilidad de estas formulaciones. Por consiguiente, para devolver la formulación a un pH deseado, se añade un ácido fuerte, tal como HCl. Se utilizan ácidos fuertes para reducir el volumen requerido para devolver el pH al intervalo deseado. Sin embargo, la adición de HCl aumenta la fuerza iónica de las formulaciones, disminuyendo así su estabilidad. Por consiguiente, existe una necesidad de identificar nuevos procedimientos y composiciones que controlen mejor el pH de las proteínas con nudo de cisteína y las proteínas de la superfamilia TGF-beta, incluyendo BMP.

Murakami Narumichi *et al.* (2002) *Journal of Biomedical Materials Research* 62(2): 169-174 divulgan rhBMP-2 como solución en un tampón que contiene 2,5% de glicina. Los documentos WO 01/78687, EP 1374905, EP 1348450 y WO 0023123 divulgan la utilización de agentes acidificantes en la preparación de composiciones farmacéuticas que comprenden varias proteínas morfogenéticas óseas. Sin embargo, ninguno de estos documentos da a conocer soluciones tampón que comprenden proteínas morfogenéticas óseas y tampones de glicilglicina o ácido tartárico.

35 **Sumario de la invención**

La presente invención se basa en el descubrimiento de que ciertos tampones aumentan la estabilidad de las formulaciones de proteínas con nudo de cisteína y de las proteínas de la superfamilia TGF-beta, que incluyen la familia de proteínas morfogenéticas óseas (BMP), específicamente las formulaciones líquidas o en solución y las formulaciones liofilizadas. En particular, cuando estas proteínas, que son básicas, se añaden a ciertos tampones en altas concentraciones, el pH del tampón aumenta. Un factor restrictivo hasta la fecha para la utilización óptima de las BMP, en particular en regímenes terapéuticos, han sido las formulaciones de BMP en solución líquida con valores de pH superiores a $3,0 \pm 0,2$ y las formulaciones liofilizadas de BMP que tienen un pH superior a 3,5 no son estables a largo plazo y están sometidas a desnaturalización y aglomeración. La utilización de tampones de la técnica anterior, tales como el lactato de sodio ha limitado las concentraciones BMP en formulaciones y también ha limitado la estabilidad de las BMP en estas formulaciones ya que deben añadirse ácidos fuertes para estabilizar el pH, aumentando así la fuerza iónica de las formulaciones. La presente invención permite al experto en la materia preparar una formulación de BMP estable, mucho más concentrada para su utilización en diversas indicaciones terapéuticas. Además, la invención proporciona un procedimiento de preparación más robusto que permite un mayor control del pH durante el procedimiento de preparación proporcionando con ello una mayor uniformidad entre lotes de formulaciones de BMP producidos.

En un aspecto, la invención comprende una solución que incluye una proteína morfogenética ósea y un tampón acuoso de glicilglicina. Según una forma de realización, la proteína morfogenética ósea puede ser cualquiera de entre BMP-2, BMP-4, BMP-5, BMP-6, BMP-7, GDF-5, GDF-6 o GDF-7. En una forma de realización preferida, la BMP es BMP-7. El pH de la solución puede estar comprendido entre aproximadamente 2,5 y 4,0, más preferentemente entre aproximadamente 2,8 y 3,5, y aún más preferentemente entre aproximadamente 2,8 y 3,2. El tampón de glicilglicina puede tener una concentración entre aproximadamente 1 mM y 100 mM, entre aproximadamente 2 mM y 20 mM, aún más entre aproximadamente 5 mM y 15 mM, o aproximadamente 10 mM. La concentración de las proteínas morfogenéticas óseas en la solución puede ser de aproximadamente 0,01 mg/ml a 40 mg/ml, de aproximadamente 0,1 mg/ml a 1 mg/ml, o de aproximadamente 0,1 mg/ml a aproximadamente 20 mg/ml, o de aproximadamente 1 mg/ml a 20 mg/ml. Según una forma de realización, el pH de la solución no varía en más de aproximadamente 0,2 unidades de pH en el almacenamiento entre 5 y 40°C durante seis meses o como máximo 36 meses.

La solución también puede incluir un lioprotector, por ejemplo, azúcar, tal como manitol, manosa, lactosa, sacarosa o

trehalosa, o cualesquiera de las combinaciones de estos azúcares. En otra forma de realización, el lioprotector es preferentemente manitol, manosa o trehalosa. Por ejemplo, la trehalosa se pueden incluir en la cantidad de aproximadamente 1% a 15% (p/v), o desde aproximadamente 3% a 10% (p/v). En una forma de realización preferida, la trehalosa no excede de 9% (p/v).

5 La solución también puede incluir un antioxidante. Por ejemplo, el antioxidante puede ser metionina, ácido ascórbico, alcohol bencílico, glutatión, m-cresol, EDTA, metabisulfito de sodio o tioglicerol. En una forma de realización preferida, el antioxidante es la metionina. En otra forma de realización, la solución no contiene un antioxidante.

10 En otro aspecto, la invención comprende una composición sólida que incluye una proteína morfogenética ósea y glicilglicina, una sal de glicilglicina, o una combinación de glicilglicina y una sal de glicilglicina. En otra forma de realización, la sal de glicilglicina es la glicilglicina HCl. La composición sólida puede incluir un lioprotector, por ejemplo, un azúcar. El azúcar puede ser manitol, lactosa, sacarosa o trehalosa o cualquier combinación de estos azúcares. Por ejemplo, el azúcar puede ser trehalosa que puede incluirse, por ejemplo, en una proporción de proteína morfogenética ósea a trehalosa de aproximadamente $7 \times 10^{-5}:1$ (p/p) a 1,3:1 (p/p). La proporción de proteína morfogenética ósea a glicilglicina, sal de glicilglicina, glicilglicina HCl o combinación de glicilglicina y sal de glicilglicina puede ser, por ejemplo, de aproximadamente $8 \times 10^{-4}:1$ (p/p) a aproximadamente 300:1 (p/p). La composición sólida puede incluir también un antioxidante. El antioxidante puede ser, por ejemplo, ácido ascórbico, alcohol bencílico, glutatión, m-cresol, tioglicerol y metionina. En una forma de realización preferida, el antioxidante es la metionina.

20 La composición sólida puede incluir también un tensioactivo. Por ejemplo, en una forma de realización, el tensioactivo es uno de entre polisorbato 20, polisorbato 80 o poloxámero 407. El agente tensioactivo puede estar presente en un intervalo de aproximadamente 0,001% a 0,5% (p/p). En una forma de realización preferida, el tensioactivo es polisorbato 20 a aproximadamente 0,01% (p/p). En una forma de realización, la composición no incluye un agente tensioactivo.

25 Una composición sólida puede prepararse liofilizando la solución de proteína morfogenética ósea y glicilglicina. En una forma de realización, la composición liofilizada no incluye manitol.

30 En otro aspecto aún, la invención comprende una solución que incluye una proteína morfogenética ósea y un tampón de ácido tartárico acuoso. En una forma de realización, la proteína morfogenética ósea puede ser cualquiera de entre BMP-2, BMP-4, BMP-5, BMP-6, BMP-7, GDF-5, GDF-6 o GDF-7. En una forma de realización preferida, la BMP es la BMP-7. El pH de la solución puede estar comprendido entre aproximadamente 2,5 a aproximadamente 4,0, más preferentemente de aproximadamente 2,8 a 3,5, y aún más preferentemente de aproximadamente 2,8 a 3,2. El tampón de ácido tartárico puede tener una concentración desde aproximadamente 1 mM hasta 100 mM, desde aproximadamente 2 mM a 20 mM, más aún desde aproximadamente 5 mM hasta 15 mM, o aproximadamente 10 mM. La concentración de la proteína morfogenética ósea en la solución es desde aproximadamente 0,01 mg/ml hasta 40 mg/ml, desde aproximadamente 1 mg/ml hasta 20 mg/ml, desde aproximadamente 0,1 mg/ml hasta 1 mg/ml, o desde aproximadamente 0,1 mg/ml hasta 20 mg/ml.

35 En una forma de realización, el pH de la solución no varía más de aproximadamente 0,2 unidades de pH en una formulación líquida, como un liofilizado, o como una solución redisuelta preparada a partir de un liofilizado.

40 [0012] En el caso del ácido tartárico, la solución también puede incluir un lioprotector, por ejemplo, azúcar, tal como manitol, lactosa, sacarosa o trehalosa, o cualquier combinación de estos azúcares. Por ejemplo, la trehalosa se puede incluir en una cantidad de aproximadamente 1% a 15% (p/v), o desde aproximadamente 3% a 10% (p/v). En una forma de realización preferida, la trehalosa no excede de 9% (p/v). La solución también puede incluir un antioxidante. Por ejemplo, el antioxidante puede ser metionina, ácido ascórbico, alcohol bencílico, glutatión, m-cresol, o tioglicerol. En una forma de realización, preferida el antioxidante es la metionina. En otra forma de realización, la solución no contiene un antioxidante. La composición sólida puede incluir también un agente tensioactivo. Por ejemplo, en una forma de realización, el tensioactivo es polisorbato 20, polisorbato 80, o poloxámero 407. El agente tensioactivo, está presente, por ejemplo, en un intervalo de aproximadamente 0,001% a 0,5% (p/p). En una forma de realización preferida, el tensioactivo es polisorbato 20 a aproximadamente 0,01% (p/p). En una forma de realización, la composición no incluye un tensioactivo.

45 En un aspecto relacionado, la invención comprende una composición sólida que incluye una proteína morfogenética ósea y ácido tartárico, una sal tartrato, o una combinación de ácido tartárico y una sal de tartrato. El ácido tartárico y/o sal tartrato puede incluir cualquier enantiómero o estereoisómero de tartrato incluyendo ácido tartárico (+) (también conocido como ácido dextrotartárico), ácido tartárico (-) (también conocido como ácido levotartárico), combinaciones de los mismos (también conocidas como ácido racémico), y estereoisómeros de ácido dextrotartárico (también conocido como ácido mesotartárico). En una forma de realización preferida, el ácido tartárico es ácido tartárico (+) o ácido dextrotartárico. La composición sólida puede incluir un lioprotector, por ejemplo, un azúcar. El azúcar puede ser manitol, lactosa, sacarosa o trehalosa o cualquier combinación de estos azúcares. Por ejemplo, el azúcar puede ser trehalosa que se puede incluir, por ejemplo, en una proporción de proteína morfogenética ósea a trehalosa de aproximadamente $7 \times 10^{-5}:1$ (p/p) a 1,3:1 (p/p). La proporción de proteína morfogenética ósea a ácido

tartárico, sal tartrato o una combinación de ácido tartárico y la sal tartrato puede ser, por ejemplo, aproximadamente 7×10^{-4} :1 a 270:1 (p/p). En una forma de realización preferida, la relación es de aproximadamente 0,07:1 a 1,3:1 (p/p) proteína a ácido tartárico, sal tartrato, o una combinación de ácido tartárico y la sal tartrato. La composición sólida puede incluir también un antioxidante. El antioxidante puede ser, por ejemplo, ácido ascórbico, alcohol bencílico, glutatión, m-cresol, tioglicerol, y metionina. La composición sólida puede incluir también un agente tensioactivo tal como polisorbato 20, polisorbato 80, poloxámero 188, o poloxámero 407. El tensioactivo puede estar comprendido en un intervalo de aproximadamente 0,001% a 0,5% (p/p). En una forma de realización preferida, el tensioactivo es polisorbato 20 a aproximadamente 0,01% (p/p). En otra forma de realización, la composición no contiene un tensioactivo.

Una composición sólida puede prepararse por liofilización de la solución de proteína morfogenética ósea y ácido tartárico. En una forma de realización, la composición liofilizada no incluye manitol.

Breve descripción de las figuras

La figura 1 es un gráfico de líneas que representa la concentración de BMP-7 (mg/ml) frente al pH de una solución que contiene ácido tartárico (1), glicilglicina (2), ácido málico (3), ácido láctico (4), ácido aspártico (5) o ácido succínico (6) y 9% de trehalosa como se describe en el ejemplo 2.

La figura 2 es un gráfico de líneas que representa el porcentaje de aglomeración de BMP-7 a lo largo del tiempo en presencia de glicilglicina pH 3,1 (1), lactato pH 3,5 (2), tartrato pH 3,1 (3), lactato más NaCl 10 mM, pH 3,1 (4) y lactato más NaCl 10 mM, 20 mM, metionina pH 3,1 (5) como se describe en el Ejemplo 3.

La figura 3 A es un gráfico de líneas que representa el porcentaje de aglomeración a lo largo del tiempo de una formulación liofilizada de 1 mg/ml de BMP-7 mantenida a 40°C, mientras que la figura 3B es un gráfico de líneas que representa el porcentaje de aglomeración a lo largo del tiempo de una formulación liofilizada de 16 mg/ml de BMP-7 mantenida a 40°C.

La figura 4 es un gráfico de líneas que representa el porcentaje de aglomeración a lo largo del tiempo de una formulación liofilizada de 1 mg/ml de BMP-7 que contiene 10 mM de glicilglicina, lactato 10 mM o tartrato 10 mM.

La figura 5 es la secuencia de aminoácidos de BMP-7 madura humana (SEC. ID. n° 1).

La figura 6 es la secuencia de aminoácidos de BMP-2 madura humana (SEC. ID. n° 2).

La figura 7 es la secuencia de aminoácidos de BMP-6 madura humana (SEC ID n° 3).

La figura 8 es la secuencia de aminoácidos de BMP-4 madura humana (SEC. ID. n° 4).

La figura 9 es la secuencia de aminoácidos de BMP-5 madura humana (SEC. ID. n° 5).

La figura 10 es la secuencia de aminoácidos de GDF-5 madura humana (SEC. ID. n° 6).

La figura 11 es la secuencia de aminoácidos de GDF-6 madura humana (SEC ID n°: 7).

La figura 12 es la secuencia de aminoácidos de GDF-7 madura humana (SEC. ID. n° 8).

Descripción detallada de la invención

La estabilidad de las proteínas de la familia del nudo de cisteína líquidas o redisueltas, incluyendo las proteínas de la superfamilia TGF- β , tales como las BMP depende del pH y de la fuerza iónica de la formulación, siendo el intervalo de pH deseado $3,0 \pm 0,2$. La adición de bajas concentraciones de estas proteínas, es decir, menos de 2 mg/ml, no afecta significativamente el pH de la formulación resultante. Sin embargo, a medida que aumenta la concentración de estas proteínas, es decir, es superior a 2 mg/ml, aumenta el pH de la formulación, por ejemplo, pH mayor que 3,4. Debido a la inestabilidad de estas proteínas con fuerza iónica creciente, existe un límite para la concentración de tampón y los ácidos que ajustan el pH que puede utilizarse para mitigar el aumento observado en el pH.

Los solicitantes han descubierto sorprendente e inesperadamente que la preparación de estas formulaciones de proteínas, tales como con las BMP, utilizando un tampón acuoso de glicilglicina o un tampón ácido tartárico elimina la necesidad de reducir el pH de la formulación añadiendo un ácido fuerte después de añadir la proteína.

Las ventajas de seleccionar un tampón que controla el pH en todo un intervalo de concentración más amplio de BMP incluyen menos manipulaciones del procedimiento de preparación, incluyendo la eliminación o reducción de la necesidad de ajustar el pH de la formulación con un ácido fuerte, por ejemplo, HCl, o una base fuerte, por ejemplo, NaOH. Esto aumenta la estabilidad del producto farmacéutico BMP al reducir la fuerza iónica de la formulación, reduce la desnaturalización y/o la aglomeración de la proteína BMP y aumenta el intervalo de concentración factible

para un producto farmacéutico estable, liofilizado de BMP.

Es importante que las formulaciones que contienen las BMP se preparen al pH apropiado $3,0 \pm 0,2$ como miembros de la familia BMP de proteínas son intrínsecamente insolubles en condiciones fisiológicas, es decir, a pH fisiológico, especialmente a concentraciones en exceso de aproximadamente 1 mg/ml. Por consiguiente, es necesario controlar el pH para asegurar la solubilidad de las cantidades necesarias de proteína BMP en la formulación.

Formulaciones

Las formulaciones según la invención incluyen soluciones (en forma líquida) tales como, pero no limitadas a liofilizados redisueltos y a formas sólidas tales como, pero no limitadas a las formas liofilizadas, geles, partículas microencapsuladas y pastas. La invención comprende además combinaciones de formulaciones líquidas, liofilizados y soluciones líquidas preparadas a partir de liofilizados redisueltos utilizadas en combinación con los geles, pastas o partículas.

Por ejemplo, en una forma de realización según la invención, la formulación es una solución que incluye un tampón acuoso y una proteína BMP. Por ejemplo, el tampón puede ser glicilglicina, ácido tartárico, ácido málico, ácido láctico, ácido aspártico o ácido succínico. En una forma de realización preferida, el tampón es glicilglicina, mientras que en otra forma de realización preferida, el tampón es ácido tartárico. En otra forma de realización, el tampón es una combinación de dos o más de entre glicilglicina, ácido tartárico, ácido málico, ácido láctico, ácido aspártico o ácido succínico. Por ejemplo, en una forma de realización, el tampón es ácido el tartárico y la glicilglicina.

En otra forma de realización, el tampón de glicilglicina tiene una concentración de aproximadamente 1 mM a 100 mM, más preferentemente de aproximadamente 2 mM a 20 mM, y aún más preferentemente de aproximadamente 5 mM a 15 mM, y aún más preferentemente, la concentración de tampón de glicilglicina es de aproximadamente 10 mM.

Según otra forma de realización, la formulación en solución líquida incluye además un estabilizante. Por ejemplo, el estabilizante puede ser prolina, glicina, valina, isoleucina o leucina. En una forma de realización preferida, el estabilizante es prolina, mientras que en otra forma de realización, el estabilizante es una combinación de dos o más de entre prolina, glicina, valina, isoleucina o leucina.

Según una forma de realización, la BMP es BMP-7. Según otra forma de realización, la BMP es BMP-2, -4, -5, -6 o -9. Según otra forma de realización, la BMP es GDF-5, -6 o -7. La concentración de BMP en la formulación está comprendida, por ejemplo, entre aproximadamente 0,01 mg/ml y 40 mg/ml. En otra forma de realización aún, la concentración de proteína BMP está comprendida entre aproximadamente 1 mg/ml y 20 mg/ml. Una concentración preferida de BMP está comprendida entre aproximadamente 0,1 mg/ml y 1 mg/ml; una concentración más preferida de BMP está comprendida entre aproximadamente 0,1 mg/ml y 20 mg/ml, y una concentración más preferida de BMP está comprendida entre aproximadamente 0,1 mg/ml y 1 mg/ml.

Incluso en otra forma de realización, el pH de la solución de formulación está comprendida entre aproximadamente 2,5 y 4,0, más preferentemente entre aproximadamente 2,8 y 3,5 y aún más preferentemente entre aproximadamente 2,8 y 3,2.

En otra forma de realización, la liofilización de una formulación líquida de la invención descrita en la presente memoria proporciona una formulación sólida.

En otra forma de realización, la formulación es una forma sólida derivada de una solución de un tampón y una proteína BMP. Por ejemplo, el tampón puede ser glicilglicina, tartrato, malato, lactato, aspartato, succinato o una sal de glicilglicina, tartrato, malato, lactato, aspartato o succinato. En una forma de realización preferida, el tampón es glicilglicina o una sal de glicilglicina. En otra forma de realización preferida, el tampón es una sal de tartrato.

Según otra forma de realización, la formulación sólida incluye un estabilizante. Por ejemplo, el estabilizante puede ser prolina, glicina, valina, isoleucina, leucina o. En una forma de realización preferida, el estabilizante es prolina. En otra forma de realización, el estabilizante es una combinación de dos o más de entre prolina, glicina, valina, isoleucina, o leucina.

Según una forma de realización, la BMP es BMP-7. Según otra forma de realización, la BMP es BMP-2, -4, -5, -6 ó -9. Según otra forma de realización, la BMP es GDF-5, -6 ó -7.

En una forma de realización, la proporción de BMP al tampón es de aproximadamente $7,7 \times 10^{-4}:1$ a 310:1 (p/p). Por ejemplo, la proporción de BMP a una sal de glicilglicina es de aproximadamente $7,7 \times 10^{-4}:1$ a 310: 1 (p/p). Por ejemplo, la proporción de BMP a ácido tartárico o su sal es de aproximadamente $6,7 \times 10^{-4}:1$ a 270:1

En otra forma de realización, la formulación en forma líquida o sólida, incluye además una lioprotector. En una forma de realización, el lioprotector es un azúcar. Por ejemplo, el azúcar puede ser manitol, lactosa, sacarosa, trehalosa o

una combinación de dos o más de estos azúcares. En una forma de realización preferida, el azúcar es la trehalosa. El azúcar puede ser añadido en una cantidad entre aproximadamente 1% y 15% (p/v) para una formulación de la invención en forma líquida, más preferentemente entre aproximadamente 3% y 10% (p/v). En una forma de realización preferida, el azúcar no excede de 9% (p/v). En otra forma de realización, el azúcar está presente en una cantidad entre aproximadamente $1:7 \times 10^{-5}$ y 1:1,3 (p/p) de azúcar: BMP en una formulación en forma sólida.

En otra forma de realización, la formulación líquida o sólida, incluye además un antioxidante. Por ejemplo, el antioxidante puede ser metionina, ácido ascórbico, alcohol bencílico, glutatión, m-cresol o tioglicerol. Un antioxidante preferido es la metionina.

La Tabla 1 muestra a continuación los componentes de varios tampones de glicilglicina que se pueden prepararse según la invención. El tampón de glicilglicina consta de glicilglicina, glicilglicina-HCl, sales de glicilglicina, o una combinación de los mismos.

Los componentes de la formulación, específicamente el porcentaje de trehalosa, pueden ajustarse dos para proporcionar la osmolalidad objetivo.

Tabla 1. Formulaciones con glicilglicina

Componente	Intervalo	Preferido	Proporción BMP:Componente (Baja)	Proporción BMP:Componente (Alta)
BMP	0,01 - 40 mg/ml	0,1 - 1 mg/ml o 1 - 20 mg/ml	N/A	N/A
Glicilglicina*	1 – 100 mM (0,13 – 13 mg/ml)	10 mM (1,3 mg/ml)	$7,7 \times 10^{-4}$ (mg/mg)	308 (mg/mg)
Trehalosa	3 – 14% (p/v) (30-140 mg/ml)	9% (p/v) (90 mg/ml)	$7,1 \times 10^{-5}$ (mg/mg)	1,3 (mg/mg)
Metionina	0 – 100 mM (0 – 15 mg/ml)	20 mM (3 mg/ml)	$6,7 \times 10^{-4}$ (mg/mg)	N/A (el valor sería 40/0 mg/mg)
Polisorbato 20	0 – 0,5% (p/v) (0-5 mg/ml)	0,01% (p/v)	0,02 (mg/mg)	N/A (el valor sería 40/0 mg/mg)
Osmolalidad**	N/A	300 ± 30 mOsm/kg	N/A	N/A

La Tabla 2 muestra a continuación los componentes de varios tampones de tartrato que pueden prepararse según la invención. Los componentes de la formulación, específicamente el porcentaje de trehalosa, pueden ajustarse para producir la osmolalidad objetivo.

Tabla 2. Formulaciones con tartrato

Componente	Intervalo	Preferido	Proporción BMP:Componente (Baja)	Proporción BMP:Componente (Alta)
BMP	0,01 - 40 mg/ml	0,1 - 1 mg/ml o 1 - 20 mg/ml	N/A	N/A
Ácido tartárico*	1 – 100 mM (0,15 – 15 mg/ml)	10 mM (1,5 mg/ml)	$6,7 \times 10^{-4}$ (mg/mg)	267 (mg/mg)
Trehalosa	3 – 14% (p/v) (30-140 mg/ml)	9% (p/v) (90 mg/ml)	$7,1 \times 10^{-5}$ (mg/mg)	1,3 (mg/mg)
Metionina	0 – 100 mM (0 – 15 mg/ml)	20 mM (3 mg/ml)	$6,7 \times 10^{-4}$ (mg/mg)	N/A
Polisorbato 20	0 – 0,5% (p/v) (0-5 mg/ml)	0,01% (p/v)	0,02 (mg/mg)	N/A
Osmolalidad**	N/A	300 ± 30 mOsm/kg	N/A	N/A

Una de las ventajas inesperadas de las formulaciones de la invención es que las formulaciones mantienen su estabilidad a lo largo del tiempo. Por ejemplo, cuando una formulación en solución según la invención se almacena a

40°C durante 6 meses, el pH no varía más de aproximadamente 0,2 unidades de pH.

Proteínas morfogenéticas óseas

5 Para las composiciones de la presente invención se prefieren las proteínas BMP de la presente invención. Las BMP pertenecen a la superfamilia TGF- β . Las proteínas de la superfamilia TGF- β son citocinas caracterizadas por los
 10 residuos de cisteína conservados en seis. El genoma humano contiene aproximadamente 42 marcos de lectura abiertos que codifican las proteínas de la superfamilia TGF- β . Las proteínas de la superfamilia TGF- β pueden dividirse al menos en la subfamilia BMP y la subfamilia TGF- β basándose en la similitud de secuencias y en las vías
 15 específicas de señalización que activan. La subfamilia BMP comprende de manera no limitativa, BMP-2, BMP-3 (osteogenina), BMP-3b (GDF-10), BMP-4 (BMP-2b), BMP-5, BMP-6, la BMP-7 (proteína osteógena-1 u OP-1), BMP-8 (OP-2), BMP-8B (OP-3), BMP-9 (GDF-2), BMP-10, BMP-11 (GDF-11), BMP-12 (GDF-7), BMP-13 (GDF-6, CDMP-2), BMP-15 (GDF-9), BMP-16, GDF-1, GDF-3, GDF-5 (CDMP-1, MP-52), y GDF-8 (miostatina). Para la presente invención, las proteínas de la superfamilia preferidas incluyen BMP-2, -4, -5, -6 y -7 y GDF-5, -6 y -7, así como MP-52.

20 Las proteínas particularmente preferidas incluyen BMP-2, BMP-7 y GDF-5, -6 y -7. La BMP ilustrativa más preferida es la BMP-7 humana. Por otra parte, existe una variación alélica en las secuencias de BMP, entre diferentes miembros de la población humana, y existe variación de especie entre las BMP descubiertas y caracterizadas hasta la fecha. Tal como se utilizan en la presente memoria, "subfamilia BMP", "BMP", "ligandos BMP" y sus equivalentes gramaticales se refieren a los miembros de la subfamilia BMP, a menos que específicamente se indique lo contrario. Cualquiera de los miembros de la subfamilia BMP descritos en la presente memoria se pueden incluir en las formulaciones según la invención.

25 La subfamilia TGF- β comprende de manera no limitativa los TGF (por ejemplo, TGF- β 1, el TGF- β 2 y TGF- β 3), activinas (por ejemplo, activina A) e inhibinas, citocina-1 inhibidora de macrófagos (MIC-1), sustancia inhibidora de Müller, hormona anti-Müller, y el factor neurotrófico derivado de la estirpe celular glial (FNDG). Como se utiliza en la presente memoria, "subfamilia TGF- β ", "las TGF- β ", "ligandos TGF- β " y los equivalentes gramaticales se refieren a los miembros de la subfamilia TGF- β , a menos que específicamente se indique lo contrario.

30 La superfamilia TGF- β es a su vez un subconjunto de la superfamilia de citocinas nudo cisteína. Otros miembros de la superfamilia de citocinas nudo de cisteína comprenden de manera no limitativa el factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF), al factor de crecimiento vascular endotelial (VEGF), al factor de crecimiento placentario (PIGF), a la noggin, a las neurotrofinas (BDNF, NT3, NT4, y β NGF), a la gonadotropina, a la folitropina, lutropina, interleucina-17 y al coagulígeno.

35 Las publicaciones que divulgan estas secuencias, así como sus propiedades químicas y físicas, incluyen: BMP-7 y OP-2 (patente US n° 5.011.691; patente US n° 5.266.683; Ozkaynak *et al.*, EMBO J., 9, págs. 2085-2093 (1990); OP-3 (documento WO 94/10203 (PCT US93/10520)), BMP-2, BMP-4, (documento WO 88/00205; Wozney *et al.*, *Science*, 242, págs. 1528-1534 (1988)), BMP-5 y BMP-6, (Celeste *et al.*, PNAS, 87, 9843-9847 (1990)), Vgr-1 (Lyons *et al.*, PNAS, 86, págs. 4554-4558 (1989)); DPP (Padgett *et al.* *Nature*, 325, págs. 81-84 (1987)); Vg-1 (Weeks, *Cell*, 51, págs. 861-867 (1987)); BMP-9 (documento WO 95/33830 (PCT/US95/07084)); BMP-10 (documento WO 94/26893 (PCT/US94/05290)); BMP-11 (documento WO 94/26892 (PCT/US94/05288)); BMP-12 (documento WO 95/16035 (PCT/US94/14030)), BMP-13 (documento WO 95/16035 (PCT/US94/14030)), GDF-1 (documento WO 92/00382 (PCT/US91/04096) y Lee *et al.* PNAS, 88, págs. 4250-4254 (1991); GDF-8 (documento WO 94/21681 (PCT/US94/03019), GDF-9 (documento WO 94/15966 (PCT/US94/00685), GDF-10 (documento WO 95/10539 (PCT/US94/11440), GDF-11 (documento WO 96/01845 (PCT/US95/08543), BMP-15 (documento WO 96/36710 (PCT/US96/06540), MP-121 (documento WO 96/01316 (PCT/EP95/02552), GDF-5 (CDMP-1, MP52) (documento WO 94/15949 (PCT/US94/00657) y documento WO 96/14335 (PCT/US94/12814) y documento WO 93/16099 (PCT/EP93/00350)); GDF-6 (CDMP-2, BMP 13) (documento WO 95/01801 (PCT/US94/07762) y documento WO 96/14335 y documento WO 95/10635 (PCT/US94/14030)); GDF-7 (CDMP-3, BMP 12) (documento WO 95/10802 (PCT/US94/07799) y documento WO 95/10635 (PCT/US94/14030)) esas publicaciones se incorporan en la presente memoria como referencia.

55 Tal como se utiliza en la presente memoria, "miembro de la superfamilia TGF- β " o "proteína de la superfamilia TGF- β ", hace referencia a una proteína conocida por los expertos en la materia como un miembro de la superfamilia del factor β de crecimiento transformante (TGF- β). Estructuralmente, dichas proteínas son homodímeros o heterodímeros expresados como cadenas polipeptídicas precursoras grandes que contienen una secuencia señal hidrófoba, una región pro en el terminal N de varios cientos de aminoácidos, y un dominio maduro que comprende
 60 una región variable terminal N y una región muy conservada en el terminal C que contiene aproximadamente 100 aminoácidos con un motivo de cisteína característico que tiene un esqueleto conservado con seis o siete cisteínas. Estas proteínas estructuralmente relacionadas se ha identificado que están implicadas en varios episodios de desarrollo.

65 El término "proteína morfogenética" se refiere a una proteína que pertenece a la superfamilia TGF- β de proteínas que tiene actividad morfogenética verdadera. Por ejemplo, dicha proteína es capaz de provocar a las células madre

para que proliferen y/o iniciar una cascada de episodios en un vía de diferenciación que conduce a la formación de tejido cartilaginoso, óseo, tendones, ligamentos, neuronal u otros tipos de tejido diferenciado, dependiendo de las señales ambientales locales. Por lo tanto, las proteínas morfogenéticas útiles en esta invención puede comportarse de manera diferente en diferentes entornos. En determinadas formas de realización, una proteína morfogenética de la presente invención puede ser una especie homodímera o una especie heterodímera.

El término "proteína osteógena (OP)" se refiere a una proteína morfogenética que también es capaz de provocar a una célula madre para que forme cartílago y/o hueso. El hueso puede ser hueso intramembranoso o hueso endocondrial. La mayoría de las proteínas osteógenas son miembros de la subfamilia BMP y son por tanto, también BMP. Sin embargo, lo contrario puede no ser cierto. Según la presente invención, una BMP identificada por homología de secuencia de ADN o identidad de secuencia de aminoácidos también debe tener actividad osteógena o condrogénica demostrable en un bioanálisis funcional para ser una proteína osteógena. Bioanálisis apropiados son bien conocidos en la técnica; un bioanálisis particularmente útil es el ensayo de formación de hueso heterotópico (véase por ejemplo, la patente de EE.UU. nº 5.011.691; la patente de EE.UU. nº 5.266.683).

Las BMP se expresan naturalmente como proproteínas que comprenden un largo prodominio, uno o más sitios de escisión y un dominio maduro. Esta proproteína es procesada después por la maquinaria celular para producir una molécula dimerica madura de BMP. El prodominio se cree que ayuda en el plegamiento correcto y el tratamiento de las BMP. Además, en algunas pero no todas las BMP, el prodominio puede unirse no por enlace covalente al dominio maduro y puede actuar como un acompañante, así como un inhibidor (por ejemplo, Thies *et. al.* (2001) *Growth Factors*, 18:251-259).

Estructuralmente, las BMP son proteínas dimericas de nudo de cisteína. Cada monómero de BMP comprende múltiples enlaces disulfuro intramoleculares. Un enlace disulfuro intermolecular adicional media en la dimerización en la mayoría de las BMP. Las BMP pueden formar homodímeros. Algunas BMP pueden formar heterodímeros.

La transducción de señal de BMP se inicia cuando un dímero de BMP une receptores de serina/treonina cinasa dos de tipo I y dos de tipo II. Los receptores de tipo I comprenden de manera no limitativa ALK-1, ALK-2 (también denominado ActRIa o ActRI), ALK-3 (también denominado BMPRIa) y ALK 6 (también denominado BMPRIb). Los receptores tipo II comprenden de manera no limitativa, ActRIIa (también denominado ActRII), ActRIIb y BMPRII. El genoma humano contiene 12 miembros de la familia del receptor de serina/treonina cinasa, incluyendo 7 receptores de tipo I y 5 de tipo II, todos los cuales están implicados en la señalización de TGF- β (Manning *et al.*, 2002, cuyas descripciones están incorporadas en la presente memoria como referencia). Después del enlace a BMP, los receptores de tipo II fosforilan a los receptores de tipo I, los receptores de tipo I fosforilan a los miembros de la familia Smad de factores de transcripción, y los Smads se trasladan al núcleo y activan la expresión de numerosos genes.

Las BMP también interactúan con inhibidores, receptores solubles, y los receptores con señuelo, incluyendo, pero sin limitarse a, BAMBI (BMP e inhibidor unido a la membrana por activina), BMPER (regulador derivado del precursor de células endoteliales que se unen por BMP), Cerberus, cordin, cordinoide, Dan, Dante, follistatina, proteína relacionada con follistatina (FSRP), ectodina, gremlina, noggin, proteína relacionada con Dan y Cerberus (PRDC), esclerostina, esclerostinoide, y gen-1 asociado a la sensibilización uterina (USAG-1). Por otra parte, las BMP pueden interactuar con co-receptores, por ejemplo BMP-2 y BMP-4 se unen al co-receptor DRAGON (Samad *et al.* (2005) *J. Biol. Chem.*, 280:14122-14129), y componentes extracelulares de la matriz, tales como sulfato de heparina y heparina (Irie *et al.* (2003) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 308:858-865).

Como se contempla en la presente memoria, el término "BMP" se refiere a una proteína que pertenece a la subfamilia BMP de la superfamilia TGF- β de proteínas definida sobre la base de la homología de ADN y la identidad de secuencia de aminoácidos. Según esta invención, una proteína pertenece a la subfamilia BMP cuando tiene al menos 50% de identidad de secuencia de aminoácidos con un miembro conocido de la subfamilia BMP dentro del dominio conservado rico en cisteína del terminal C que caracteriza a la subfamilia BMP. Los miembros de la subfamilia BMP puede tener menos de 50% de identidad de secuencia de ADN o de aminoácidos en total. Tal como se utiliza en la presente memoria, el término "BMP" se refiere además a las proteínas que son variantes de secuencia de aminoácidos, variantes de dominio intercambiado y truncamientos y fragmentos activos de proteínas morfogenéticas óseas naturales, así como proteínas heterodiméricas formadas a partir de dos péptidos monoméricos de BMP diferentes, tales como BMP-2/7; BMP-4/7; BMP-2/6; BMP-2/5; BMP-4/7; BMP-4/5 y heterodímeros de BMP-4/6. Las variantes y heterodímeros de BMP adecuados incluyen los expuestos en los documentos US 2006/0235204; WO 07/087053; WO 05/097825; WO 00/020607; WO 00/020591; WO 00/020449; WO 05/113585; WO 95/016034 y WO 93/009229.

Según una forma de realización, una BMP utilizada en una formulación según la invención puede mantener por lo menos 80%, por lo menos 81%, por lo menos 82%, por lo menos 83%, por lo menos 84%, por lo menos 85%, por lo menos 86%, por lo menos 87%, por lo menos 88%, por lo menos 89%, por lo menos 90%, por lo menos 91%, por lo menos 92%, por lo menos 93%, por lo menos 94%, por lo menos 95%, por lo menos 96%, por lo menos 97%, por lo menos 98% o por lo menos 99% de identidad con la secuencia correspondiente de la proteína BMP natural.

Según una forma de realización, una BMP utilizada en una formulación según la invención puede mantener por lo menos 80%, por lo menos 81%, por lo menos 82%, por lo menos 83%, por lo menos 84%, por lo menos 85%, por lo menos 86%, por lo menos 87%, por lo menos 88%, por lo menos 89%, por lo menos 90%, por lo menos 91%, por lo menos 92%, por lo menos 93%, por lo menos 94%, por lo menos 95%, por lo menos 96%, por lo menos 97%, por lo menos 98% o por lo menos 99% de identidad con el dominio de cisteína conservado de la región del terminal C de la secuencia de la proteína BMP natural correspondiente.

Por "proteína natural correspondiente" se hace referencia a la versión natural de la BMP modificada. Por ejemplo, si la BMP modificada es una BMP-7 modificada, la BMP natural correspondiente es la BMP-7 natural.

Para determinar el porcentaje de identidad de dos secuencias de aminoácidos o de dos ácidos nucleicos, las secuencias se alinean con fines de comparación óptimos (por ejemplo, pueden introducirse huecos en la secuencia de una primera secuencia de aminoácidos o de ácido nucleico para la alineación óptima con una segunda secuencia de aminoácidos o de ácido nucleico). El porcentaje de identidad entre las dos secuencias es función del número de posiciones idénticas compartidas por las secuencias (es decir, % de homología = n° de posiciones idénticas/ n° total de posiciones x 100). La determinación del porcentaje de homología entre dos secuencias se puede realizar utilizando un algoritmo matemático. Un ejemplo preferido, no limitativo de un algoritmo matemático utilizado para la comparación de dos secuencias es el algoritmo de Karlin y Altschul (1990) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 87:2264-68, modificado como en Karlin y Altschul (1993) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 90:5873-77. Dicho algoritmo se incorpora en los programas NBLAST y Xblast de Altschul, *et al.* (1990) *J. Mol. Biol.* 215:403-10. Las búsquedas de nucleótidos por BLAST pueden realizarse con el programa NBLAST, puntuación = 100, longitud de palabra = 12. Las búsquedas de proteínas por BLAST se puede realizar con el programa XBLAST, puntuación = 50, longitud de palabra = 3. Para obtener alineaciones con huecos para comparación, puede utilizarse Gapped BLAST como se describe en Altschul *et al.*, (1997) *Nucleic Acids Research* 25(17):3389-3402. Cuando se utilizan los programas BLAST y Gapped BLAST, se pueden utilizar los parámetros por defecto de los respectivos programas (por ejemplo, XBLAST y NBLAST).

Utilizaciones terapéuticas

Las formulaciones de BMP de la invención, en estado sólido, pueden implantarse en un paciente mamífero, por ejemplo, una persona para tratar una amplia variedad de enfermedades. Las formulaciones BMP de la invención pueden implantarse en forma sólida, de gel o pasta, o inyectarse en el paciente en forma de gel, pasta o líquido.

Las formulaciones de BMP de la invención son útiles para tratar una amplia variedad de enfermedades. Por ejemplo, las formulaciones que contienen las BMP pueden utilizarse para tratar trastornos óseos, incluyendo la degeneración de cartílago ya sea producida por traumatismo o enfermedad inflamatoria. Por ejemplo, las enfermedades que pueden tratarse con las formulaciones de la invención incluyen la artritis reumatoide (AR) y la osteoartritis (OA) y las enfermedades autoinmunitarias como el lupus eritematoso diseminado (LED) y la esclerodermia.

Las formulaciones de BMP de la invención pueden utilizarse con eficacia para el tratamiento de enfermedades o lesiones óseas. Por ejemplo, las formulaciones se pueden utilizar para tratar una fractura ósea, tales como una fractura abierta o una fractura cerrada. Para el tratamiento de una fractura cerrada, la formulación se inyecta preferentemente en el sitio de la fractura. Para las fracturas abiertas, los defectos críticos de tamaño o pseudoartrosis persistente, las formulaciones pueden administrarse por implantación quirúrgica en el sitio de la fractura. En ambos casos, la formulación puede administrarse sola o combinada con un vehículo, matriz o estructura adecuados, como por ejemplo un cemento para huesos, un material de fosfato de calcio, un material de gel o una matriz de colágeno. Los vehículos, matrices y estructuras adecuados incluyen los divulgados en las patentes US n° 6.919.308; n° 6.949.251 y n° 7.041, 641.

En una forma de realización preferida, las formulaciones de BMP de la invención pueden utilizarse para tratar una enfermedad o lesión que produce la degradación del cartílago o un defecto del cartílago. Por ejemplo, las formulaciones se pueden aplicar a un sitio con defecto del cartílago, tales como un disco intervertebral degenerativo, u otro tejido fibrocartilaginoso, incluyendo un tendón, un ligamento o un menisco. Dichos procedimientos se exponen en la patente US n° 6.958.149. Las formulaciones de la invención también puede utilizarse para tratar un defecto o la degeneración del cartílago articular, como se expone en la solicitud PCT publicada WO 05/115438, tal como el revestimiento con cartílago de una articulación, tal como una articulación sinovial, incluyendo una rodilla, un codo, la cadera o un hombro. En esta forma de realización, la formulación se inyecta preferentemente en el espacio sinovial de la articulación. En otra forma de realización, las formulaciones de la invención se utilizan para tratar un sitio con defecto en el cartílago articular, tal como un defecto del cartílago o un defecto osteocartilaginoso, en una articulación. Dichos defectos del cartílago articular pueden ser el resultado de un proceso patológico, tal como la osteoartritis o la artritis reumatoidea o ser debidos a una lesión de la articulación. En esta forma de realización, la formulación puede inyectarse en el espacio de la articulación o puede implantarse mediante cirugía. Por ejemplo, la formulación puede colocarse dentro del defecto ya sea sola o combinada con uno o más agentes activos adicionales, una matriz o estructura de soporte, o células del estroma de la médula. La formulación puede cubrirse, opcionalmente, con una cubierta adecuada, por ejemplo un colgajo de músculo o una membrana bioabsorbible, tal como una membrana de colágeno.

Como apreciarán los expertos en la materia, la concentración de los compuestos descritos en una composición terapéutica variará dependiendo de numerosos factores, que comprenden de manera no limitativa, la dosis del fármaco a administrar y la vía de administración. La dosis preferida de fármaco que se debe administrar también es probable que dependa de variables que comprenden de manera no limitativa, el tipo y la extensión de una enfermedad, la pérdida o anomalía del tejido, el estado de salud general de cada paciente, la eficacia biológica relativa del compuesto seleccionado, la formulación del compuesto, la presencia y tipos de excipientes en la formulación y la vía de administración. La presente invención se puede suministrar a un individuo en el que el intervalo típico de las dosis es desde aproximadamente 10 ng/kg a 1 g/kg de peso corporal al día; siendo un intervalo de dosis preferido de aproximadamente 0,1 mg/kg a 100 mg/kg de peso corporal peso, y con un intervalo de dosificación más particularmente preferido de 10 a 1000 µg/dosis. En una forma de realización particularmente preferida, una dosis de 10-1000 µg de una BMP-7 se administra a un paciente aquejado de osteoartritis.

Además, como se describe a continuación, las formulaciones de proteínas, preferentemente las formulaciones de BMP de la presente invención pueden utilizarse para tratar enfermedades o lesiones de tejidos no óseos. Como comprende la presente invención, las BMP pueden provocar la cascada del desarrollo de la morfogenia ósea y la morfogenia tisular para una variedad de tejidos en mamíferos diferentes de hueso o cartílago óseo. Esta actividad morfogenética incluye la capacidad de provocar la proliferación y la diferenciación de las células madre, y la capacidad de soportar y mantener el fenotipo diferenciado en toda la evolución de episodios que dan como resultado la formación de hueso, cartílago, tejidos óseo o conectivo no mineralizados y otros tejidos del adulto.

Por ejemplo, las BMP puede utilizarse para el tratamiento con el fin de prevenir la pérdida de y/o aumento de la masa ósea en las enfermedades metabólicas óseas. Los procedimientos generales de tratamiento para prevenir la pérdida y/o aumento de la masa ósea en las enfermedades metabólicas óseas utilizando proteínas osteógenas se describen en la patente US nº 5.674.844, cuyas descripciones se incorporan en la presente memoria como referencia. Las BMP de la presente invención puede utilizarse para la regeneración del tejido periodontal. Los procedimientos generales para la regeneración del tejido periodontal utilizando proteínas osteógenas se describen en la patente US nº 5.733.878, cuyas descripciones se incorporan en la presente memoria como referencia. Las BMP puede utilizarse para la regeneración del hígado. Los procedimientos generales para la regeneración del hígado utilizando proteínas osteógenas se describen en la patente US nº 5.849.686, cuyas descripciones se incorporan en la presente memoria como referencia. Las BMP se puede utilizar para el tratamiento de la insuficiencia renal crónica. Los procedimientos generales para tratamiento de la insuficiencia renal crónica utilizando proteínas osteógenas se describen en la patente de EE.UU. nº 6.861.404, cuyas descripciones se incorporan en la presente memoria por referencia. Las BMP pueden utilizarse para mejorar la recuperación funcional después de la isquemia del sistema nervioso central o de traumatismo. Los procedimientos generales para mejorar la recuperación funcional después de la isquemia del sistema nervioso central o de traumatismo utilizando proteínas osteógenas se describen en la patente US nº 6.407.060, cuyas descripciones se incorporan en la presente memoria por referencia. Las BMP se pueden utilizar para provocar crecimiento dendrítico. Los procedimientos generales para provocar crecimiento dendrítico utilizando proteínas osteógenas se describen en la patente US nº 6.949.505, cuyas descripciones se incorporan en la presente memoria por referencia. Las BMP se puede utilizar para provocar la adherencia celular neuronal. Los procedimientos generales para la inducción de la adherencia celular neuronal utilizando proteínas osteógenas se describen en la patente US nº 6.800.603, cuyas descripciones se incorporan en la presente memoria como referencia. Las BMP se puede utilizar para el tratamiento y prevención de la enfermedad de Parkinson. Los procedimientos generales para el tratamiento y la prevención de la enfermedad de Parkinson utilizando proteínas osteógenas se describen en la patente US nº 6.506.729, cuyas descripciones se incorporan en la presente memoria como referencia.

Como otro ejemplo, las BMP también se puede utilizar para provocar dentinogenia. Hasta la fecha, la respuesta impredecible del tejido de la pulpa dental a las lesiones es un problema clínico básico en odontología. Incluso como otro ejemplo, las BMP pueden provocar efectos regenerativos en la reparación del sistema nervioso central (SNC) que pueden evaluarse utilizando un modelo de cerebro de rata punzado.

Ejemplo 1. El tampón de glicilglicina y el tampón de ácido tartárico estabilizan el pH de las formulaciones de BMP al aumentar las concentraciones de BMP

Para evaluar el potencial de tampones para mitigar el aumento de pH observado en las formulaciones de BMP de alta concentración, se analizaron seis tampones utilizando la BMP ilustrativa, BMP-7: ácido tartárico (pKa 2,98, 4,34), glicilglicina (pKa 3,14), ácido málico (pKa 3,40), ácido láctico (pKa 3,86), ácido aspártico (pKa 3,90), y ácido succínico (pKa 4,21).

Cada tampón se preparó a una concentración de 10 mM y el pH se ajustó con HCl 1 N o NaOH 1 N, según sea necesario para producir un pH final de 3,0. Cada tampón también contenía 9% de trehalosa. BMP-7 en ácido acético 50 mM a 1,6 mg/ml se concentró a 10 mg/ml y después se dializó en cada uno de los seis tampones. Después de la diálisis, la concentración de la proteína en cada tampón fue de 15 a 16 mg/ml. Se midieron la concentración de la proteína y el pH a temperatura ambiente para cada tampón. Posteriormente, cada una de las soluciones de proteína se diluyeron a 8 mg/ml y 1 mg/ml con sus tampones respectivos. Se midieron el pH y la concentración de proteína a temperatura ambiente a cada una de las concentraciones diluidas. Los resultados del pH en función de la

concentración de BMP-7 se muestra en la figura 1.

Como se muestra en la figura 1, se observó un aumento indeseable en el pH para los tampones de ácido málico, ácido láctico, ácido aspártico y ácido succínico en cuanto a aumento de concentraciones de BMP-7. Por el contrario, no se observó aumento significativo en los tampones de ácido tartárico o glicilglicina en cuanto a aumento de la concentración de BMP-7. Por consiguiente, ya sea ácido tartárico o glicilglicina se pueden utilizar como tampones a fin de mitigar los aumentos de pH resultantes de la adición de BMP-7 al tampón.

Ejemplo 2. Los tampones glicilglicina y los tampones de ácido tartárico proporcionan estabilidad a las formulaciones líquidas de BMP a lo largo del tiempo reduciendo la aglomeración

Un estudio de estabilidad de líquido se llevó a cabo para evaluar la aglomeración de proteínas en las formulaciones de BMP utilizando el BMP ilustrativo, BMP-7, con tampones de glicilglicina 10 mM (pH 3,1), tartrato 10 mM (pH 3,1), lactato 10 mM (pH 3,5), lactato 10 mM con NaCl 10 mM (pH 3,1) y lactato 10 mM con NaCl 10 mM y metionina 20 mM (pH 3,1). Las formulaciones que minimizan los cambios en la proteína, incluyendo la aglomeración, proporcionan mejor estabilidad y consistencia de las preparaciones liofilizadas. La concentración de BMP-7 fue de 16 mg/ml. Las formulaciones se llevaron a cabo en condiciones de estabilidad acelerada a 40°C durante 4 semanas. El porcentaje de aglomeración de BMP-7 en las formulaciones líquidas se midió por cromatografía de exclusión por tamaño y los resultados se muestran en la figura 2.

Como se muestra en la figura 2, las formulaciones con tampón de glicilglicina a pH 3,1 presentaban la tasa más baja de aumento de aglomeración durante el período de 4 semanas, lo que indica que la glicilglicina proporciona la mayor estabilidad a las formulaciones de BMP-7 que los demás tampones probados.

Ejemplo 3. Los tampones de glicilglicina y los tampones de ácido tartárico proporcionan estabilidad a las formulaciones liofilizadas de BMP a lo largo del tiempo al reducir la aglomeración

Se realizó un estudio de estabilidad acelerada tanto del líquido liofilizado como de BMP liofilizada y formulaciones tampón para evaluar aglomeración de BMP en formulaciones con tampones de glicilglicina HCl 10 mM de (pH 3,1), tartrato 10 mM (pH 3,1), lactato 10 mM (pH 3,1), lactato 10 mM con NaCl 10 mM (pH 3,1) y lactato 10 mM con NaCl 10 mM y metionina 20 mM (pH 3,1) utilizando el ejemplo de BMP, BMP-7. La concentración de BMP-7 era de 1 mg/ml o 16 mg/ml. Las formulaciones para el estudio de estabilidad del líquido se distribuyeron en viales y se mantuvieron a 40°C durante 2 meses o liofilizaron y se mantuvieron a 40°C durante 6 meses.

Como se muestra en la figura 3A, las formulaciones de BMP-7 que contienen lactato con metionina y glicilglicina tenían los índices de aglomeración inferiores de las memorias para los tampones de formulación a 1 mg/ml a los 6 meses. Como se muestra en la figura 3B, a 16 mg/ml, se produjo un aumento observado en la aglomeración de proteínas para todos los tampones probados. La menor aglomeración se observó en la formulación que contiene tartrato. El ejemplo demostró una mejor estabilidad asociada a las formulaciones de BMP-7 que contienen glicilglicina 10 mM, 9% de trehalosa, pH 3,0 y las formulaciones de BMP-7 que contienen tartrato 10 mM, trehalosa 9%, pH 3,0 en comparación con las formulaciones que contienen lactato 10 mM.

Ejemplo 4. Las BMP de formulaciones de tampón de glicilglicina y ácido tartárico tienen actividad biológica

Se ensaya la capacidad de BMP a partir de una solución de BMP y tampón de glicilglicina o tampón de ácido tartárico que se ha mantenido a 40°C durante 6 meses para provocar actividad de fosfatasa alcalina (ALP) en la estirpe celular ROS 17/2.8 de osteosarcoma de rata. La BMP ilustrativa, BMP-7, se ensaya por triplicado en una respuesta a la dosis de nueve puntos. En particular, se colocan células ROS 17/2.8 en placas de cultivo tisular de 96 pocillos. La BMP de la solución de glicilglicina o solución de ácido tartárico se añade a las células a las siguientes dosis: 6000, 2000, 666, 222, 74, 24, 8, 2 y 0,9 ng/ml y se incuba durante un período de 48 horas. Las células se lisan posteriormente y se evalúa la potencia de BMP-7 para provocar la actividad de ALP basándose en la CE_{50} derivada de la regresión no lineal de la densidad media óptica (DO) de las muestras. La BMP ilustrativa, BMP-7, tanto de la solución de glicilglicina como de la solución de ácido tartárico demuestran actividad biológica robusta.

Ejemplo 5. Formulaciones de BMP que contienen tampón de glicilglicina

Se prepara una formulación según la invención realizando un intercambio de tampón por diálisis, filtración en flujo tangencial o el proceso de ultrafiltración/diafiltración (UF/DF) con BMP, por ejemplo BMP-7. Se dializan 100 mg de BMP-7 en 10 ml de tampón de diálisis frente a 300 ml de tampón de glicilglicina 10 mM, trehalosa al 9% y metionina 20 mM a pH 3,0 ± 0,2 con 3 cambios de tampón de diálisis. Se prepara tampón de glicilglicina mezclando 500 ml de solución de glicilglicina-HCl 10 mM a pH 2,6 con 210 ml de glicilglicina 10 mM a pH 5,7. La concentración resultante de BMP-7 se ajusta a 1 mg/ml (aproximadamente 100 ml) utilizando tampón de diálisis y se añade polisorbato 20 al 0,01% o polisorbato 80 al 0,01% con un pH final de 3,0 ± 0,2. De manera similar, aproximadamente 100 mg a 10 g de BMP-7 en aproximadamente 10 ml a 1000 ml de tampón de diálisis se intercambian frente a 10 volúmenes de tampón de glicilglicina 10 mM por UF/DF. Los constituyentes adicionales de la formulación, tales como trehalosa, metionina, y/o polisorbato 20 se echan en cantidades deseadas. La formulación se diluye a la

concentración deseada utilizando el tampón de formulación y el pH de la formulación final es $3,0 \pm 0,2$.

Ejemplo 6. Formulaciones de BMP que contienen tampón de ácido tartárico

5 Se prepara una formulación según la invención realizando un intercambio de tampón por diálisis o filtración en flujo tangencial con BMP, por ejemplo BMP-7. Se dializan 100 mg de BMP-7 en 10 ml de tampón de diálisis frente a 300 ml de tampón de ácido tartárico 10 mM, trehalosa al 9%, y metionina 20 mM a un pH de $3,0 \pm 0,2$, con 3 cambios de tampón de diálisis. Se prepara tampón de ácido tartárico mezclando 840 ml de solución 10 mM de ácido tartárico con 310 ml de tartrato de sodio y potasio 10 mM a pH 7,2. La concentración resultante de BMP se ajusta a 1 mg/ml (aproximadamente 100 ml) utilizando tampón de diálisis y se vierte polisorbato 20 al 0,01% o polisorbato 80 al 0,01% con un pH final de $3,0 \pm 0,2$. De manera similar, aproximadamente de 100 mg a 10 g de BMP-7 en aproximadamente 10 ml a 1000 ml se intercambia frente a aproximadamente 10 volúmenes de tampón de tartrato 10 mM por UF/DF. Los constituyentes adicionales de la formulación tales como trehalosa, metionina, y/o polisorbato 20 se vierten en las cantidades deseadas. La formulación se diluye a la concentración deseada utilizando el tampón de la formulación y la formulación final está a pH $3,0 \pm 0,2$.

Ejemplo 7. Formulaciones de BMP que contienen tampón de ácido tartárico y trehalosa

20 Como se ha demostrado en la presente memoria, la glicilglicina y el tartrato controlan el pH de 7 formulaciones de BMP más eficazmente que el lactato y puede ser ventajoso en la formulación del producto farmacéutico. A fin de evaluar la estabilidad de BMP-7 liofilizada en glicilglicina y tartrato, se iniciaron estudios de estabilidad a largo plazo.

25 Se formularon tres lotes de BMP-7 a 1 mg/ml bien en lactato 10 mM, trehalosa al 9%, pH 3,0; glicilglicina 10 mM, trehalosa al 9%, pH 3,0; o tartrato 10 mM, trehalosa al 9%, pH 3,0. El pH de todas las formulaciones se controló dentro de $3,0 \pm 0,2$. El producto farmacéutico formulado se liofilizó y se iniciaron estudios de estabilidad a largo plazo a 5°C o 30°C. Se evaluó la estabilidad de los tres lotes a lo largo de 2, 6 y 9 meses.

30 La aglomeración de BMP-7 en la formulación que contiene lactato era inicialmente mayor que en la glicilglicina o el tartrato. No se produjeron cambios relevantes en la aglomeración a 5°C durante ninguna de las formulaciones. La aglomeración aumentó para todas las formulaciones a 30°C con la mínima aglomeración observada en la formulación que contiene glicilglicina (ver figura 4). Los resultados sugieren que las formulaciones de BMP-7 que contienen glicilglicina 10 mM o tartrato 10 mM pueden mejorar la estabilidad de un producto farmacéutico liofilizado en comparación con tamponación con lactato 10 mM.

35 **Listado de secuencias**

<110> Stryker Corporation Hile, David Strohmeier, Gregg

<120> TAMPONES PARA CONTROLAR EL PH DE LAS PROTEÍNAS MORFOGÉNÉTICAS ÓSEAS

40 <130> STK-096PC

<150> US 61/243,383

45 <151> 2009-09-17

<160> 8

<170> PatentIn version 3.5

50 <210> 1

<211> 139

<212> PRT

<213> Homo sapiens

55 <400> 1

Ser Thr Gly Ser Lys Gln Arg Ser Gln Asn Arg Ser Lys Thr Pro Lys
1 5 10 15

Asn Gln Glu Ala Leu Arg Met Ala Asn Val Ala Glu Asn Ser Ser Ser
20 25 30

ES 2 387 379 T3

Asp Gln Arg Gln Ala Cys Lys Lys His Glu Leu Tyr Val Ser Phe Arg
 35 40 45

Asp Leu Gly Trp Gln Asp Trp Ile Ile Ala Pro Glu Gly Tyr Ala Ala
 50 55 60

Tyr Tyr Cys Glu Gly Glu Cys Ala Phe Pro Leu Asn Ser Tyr Met Asn
 65 70 75 80

Ala Thr Asn His Ala Ile Val Gln Thr Leu Val His Phe Ile Asn Pro
 85 90 95

Glu Thr Val Pro Lys Pro Cys Cys Ala Pro Thr Gln Leu Asn Ala Ile
 100 105 110

Ser Val Leu Tyr Phe Asp Asp Ser Ser Asn Val Ile Leu Lys Lys Tyr
 115 120 125

Arg Asn Met Val Val Arg Ala Cys Gly Cys His
 130 135

<210> 2
 <211> 114
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

5

<400> 2

Gln Ala Lys His Lys Gln Arg Lys Arg Leu Lys Ser Ser Cys Lys Arg
 1 5 10 15

His Pro Leu Tyr Val Asp Phe Ser Asp Val Gly Trp Asn Asp Trp Ile
 20 25 30

Val Ala Pro Pro Gly Tyr His Ala Phe Tyr Cys His Gly Glu Cys Pro
 35 40 45

Phe Pro Leu Ala Asp His Leu Asn Ser Thr Asn His Ala Ile Val Gln
 50 55 60

Thr Leu Val Asn Ser Val Asn Ser Lys Ile Pro Lys Ala Cys Cys Val
 65 70 75 80

Pro Thr Glu Leu Ser Ala Ile Ser Met Leu Tyr Leu Asp Glu Asn Glu
 85 90 95

10

ES 2 387 379 T3

Lys Val Val Leu Lys Asn Tyr Gln Asp Met Val Val Glu Gly Cys Gly
 100 105 110

Cys Arg

5 <210> 3
 <211> 139
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 3

Ser Ala Ser Ser Arg Arg Arg Gln Gln Ser Arg Asn Arg Ser Thr Gln
 1 5 10 15

Ser Gln Asp Val Ala Arg Val Ser Ser Ala Ser Asp Tyr Asn Ser Ser
 20 25 30

Glu Leu Lys Thr Ala Cys Arg Lys His Glu Leu Tyr Val Ser Phe Gln
 35 40 45

Asp Leu Gly Trp Gln Asp Trp Ile Ile Ala Pro Lys Gly Tyr Ala Ala
 50 55 60

10 Asn Tyr Cys Asp Gly Glu Cys Ser Phe Pro Leu Asn Ala His Met Asn
 65 70 75 80

Ala Thr Asn His Ala Ile Val Gln Thr Leu Val His Leu Met Asn Pro
 85 90 95

Glu Tyr Val Pro Lys Pro Cys Cys Ala Pro Thr Lys Leu Asn Ala Ile
 100 105 110

Ser Val Leu Tyr Phe Asp Asp Asn Ser Asn Val Ile Leu Lys Lys Tyr
 115 120 125

Arg Asn Met Val Val Arg Ala Cys Gly Cys His
 130 135

15 <210> 4
 <211> 116
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 4

ES 2 387 379 T3

Ser Pro Lys His His Ser Gln Arg Ala Arg Lys Lys Asn Lys Asn Cys
1 5 10 15

Arg Arg His Ser Leu Tyr Val Asp Phe Ser Asp Val Gly Trp Asn Asp
20 25 30

Trp Ile Val Ala Pro Pro Gly Tyr Gln Ala Phe Tyr Cys His Gly Asp
35 40 45

Cys Pro Phe Pro Leu Ala Asp His Leu Asn Ser Thr Asn His Ala Ile
50 55 60

Val Gln Thr Leu Val Asn Ser Val Asn Ser Ser Ile Pro Lys Ala Cys
65 70 75 80

Cys Val Pro Thr Glu Leu Ser Ala Ile Ser Met Leu Tyr Leu Asp Glu
85 90 95

Tyr Asp Lys Val Val Leu Lys Asn Tyr Gln Glu Met Val Val Glu Gly
100 105 110

Cys Gly Cys Arg
115

<210> 5
<211> 132
5 <212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 5

Asn Gln Asn Arg Asn Lys Ser Ser Ser His Gln Asp Ser Ser Arg Met
1 5 10 15

Ser Ser Val Gly Asp Tyr Asn Thr Ser Glu Gln Lys Gln Ala Cys Lys
20 25 30

Lys His Glu Leu Tyr Val Ser Phe Arg Asp Leu Gly Trp Gln Asp Trp
35 40 45

Ile Ile Ala Pro Glu Gly Tyr Ala Ala Phe Tyr Cys Asp Gly Glu Cys
50 55 60

10

ES 2 387 379 T3

Ser Phe Pro Leu Asn Ala His Met Asn Ala Thr Asn His Ala Ile Val
65 70 75 80

Gln Thr Leu Val His Leu Met Phe Pro Asp His Val Pro Lys Pro Cys
85 90 95

Cys Ala Pro Thr Lys Leu Asn Ala Ile Ser Val Leu Tyr Phe Asp Asp
100 105 110

Ser Ser Asn Val Ile Leu Lys Lys Tyr Arg Asn Met Val Val Arg Ser
115 120 125

Cys Gly Cys His
130

<210> 6
<211> 120
5 <212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 6

Ala Pro Leu Ala Thr Arg Gln Gly Lys Arg Pro Ser Lys Asn Leu Lys
1 5 10 15

Ala Arg Cys Ser Arg Lys Ala Leu His Val Asn Phe Lys Asp Met Gly
20 25 30

Trp Asp Asp Trp Ile Ile Ala Pro Leu Glu Tyr Glu Ala Phe His Cys
35 40 45

10 Glu Gly Leu Cys Glu Phe Pro Leu Arg Ser His Leu Glu Pro Thr Asn
50 55 60

His Ala Val Ile Gln Thr Leu Met Asn Ser Met Asp Pro Glu Ser Thr
65 70 75 80

Pro Pro Thr Cys Cys Val Pro Thr Arg Leu Ser Pro Ile Ser Ile Leu
85 90 95

Phe Ile Asp Ser Ala Asn Asn Val Val Tyr Lys Gln Tyr Glu Asp Met
100 105 110

Val Val Glu Ser Cys Gly Cys Arg
115 120

15 <210> 7
<211> 120
<212> PRT
<213> Homo sapiens

ES 2 387 379 T3

<400> 7

Thr Ala Phe Ala Ser Arg His Gly Lys Arg His Gly Lys Lys Ser Arg
1 5 10 15

Leu Arg Cys Ser Lys Lys Pro Leu His Val Asn Phe Lys Glu Leu Gly
20 25 30

Trp Asp Asp Trp Ile Ile Ala Pro Leu Glu Tyr Glu Ala Tyr His Cys
35 40 45

Glu Gly Val Cys Asp Phe Pro Leu Arg Ser His Leu Glu Pro Thr Asn
50 55 60

His Ala Ile Ile Gln Thr Leu Met Asn Ser Met Asp Pro Gly Ser Thr
65 70 75 80

Pro Pro Ser Cys Cys Val Pro Thr Lys Leu Thr Pro Ile Ser Ile Leu
85 90 95

Tyr Ile Asp Ala Gly Asn Asn Val Val Tyr Lys Gln Tyr Glu Asp Met
100 105 110

Val Val Glu Ser Cys Gly Cys Arg
115 120

5

<210> 8
<211> 129
<212> PRT
<213> Homo sapiens

10

<400> 8

Thr Ala Leu Ala Gly Thr Arg Thr Ser Gln Gly Ser Gly Gly Gly Ala
1 5 10 15

Gly Arg Gly His Gly Arg Arg Gly Arg Ser Arg Cys Ser Arg Lys Pro
20 25 30

ES 2 387 379 T3

Leu His Val Asp Phe Lys Glu Leu Gly Trp Asp Asp Trp Ile Ile Ala
35 40 45

Pro Leu Asp Tyr Glu Ala Tyr His Cys Glu Gly Leu Cys Asp Phe Pro
50 55 60

Leu Arg Ser His Leu Glu Pro Thr Asn His Ala Ile Ile Gln Thr Leu
65 70 75 80

Leu Asn Ser Met Ala Pro Asp Ala Ala Pro Ala Ser Cys Cys Val Pro
85 90 95

Ala Arg Leu Ser Pro Ile Ser Ile Leu Tyr Ile Asp Ala Ala Asn Asn
100 105 110

Val Val Tyr Lys Gln Tyr Glu Asp Met Val Val Glu Ala Cys Gly Cys
115 120 125

Arg

REIVINDICACIONES

1. Solución que comprende una proteína morfogenética ósea y un tampón acuoso de glicilglicina.
- 5 2. Solución según la reivindicación 1, en la que la concentración de proteína es:
- (i) desde aproximadamente 1 mg/ml a aproximadamente 20 mg/ml;
 - (ii) desde aproximadamente 0,1 mg/ml a aproximadamente 20 mg/ml;
 - 10 (iii) desde aproximadamente 0,1 mg/ml a aproximadamente 1 mg/ml; o
 - (iv) desde aproximadamente 0,1 mg/ml a aproximadamente 40 mg/ml.
3. Composición sólida que comprende:
- (i) una proteína morfogenética ósea; y
 - 15 (ii) glicilglicina, una sal de glicilglicina o una combinación de las mismas.
4. Composición sólida según la reivindicación 3, en la que:
- (i) la sal de glicilglicina es la glicilglicina HCl; y/o
 - 20 (ii) la proporción de proteína morfogenética ósea a glicilglicina, sal de glicilglicina, o la combinación de las mismas es de aproximadamente 8×10^{-4} :1 a aproximadamente 310:1 (p/p).
5. Solución que comprende una proteína morfogenética ósea y un tampón acuoso de ácido tartárico.
- 25 6. Solución según la reivindicación 5, en la que la concentración de proteína es:
- (i) desde aproximadamente 0,01 mg/ml a aproximadamente 40 mg/ml;
 - (ii) desde aproximadamente 1 mg/ml a aproximadamente 20 mg/ml;
 - 30 (iii) desde aproximadamente 0,1 mg/ml a aproximadamente 1 mg/ml; o
 - (iv) desde aproximadamente 0,1 mg/ml a aproximadamente 20 mg/ml.
7. Composición sólida que comprende:
- (i) una proteína morfogenética ósea; y
 - 35 (ii) ácido tartárico, una sal de tartrato o una combinación de los mismos,
- opcionalmente en la que la proporción de proteína morfogenética ósea a ácido tartárico, sal tartrato, o la combinación de los mismos es de aproximadamente 7×10^{-4} :1 a aproximadamente 270:1 (p/p).
- 40 8. Solución o composición según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en la que la proteína morfogenética ósea se selecciona de entre BMP-2, BMP-4, BMP-5, BMP-6, BMP-7, GDF-5, GDF-6 y GDF-7.
9. Solución según cualquiera de las reivindicaciones 1, 2, 5, 6 u 8, en la que el pH de la solución es de aproximadamente:
- 45 (i) 2,5 a aproximadamente 4,0;
 - (ii) 2,8 a aproximadamente 3,5; o
 - (iii) 2,8 a aproximadamente 3,2.
- 50 10. Solución según cualquiera de las reivindicaciones 1, 2, 5, 6, 8 o 9, en la que el tampón presenta una concentración de glicilglicina o ácido tartárico:
- (i) de aproximadamente 1 mM a aproximadamente 100 mM;
 - 55 (ii) de aproximadamente 2 mM a aproximadamente 20 mM;
 - (iii) de aproximadamente 5 mM a aproximadamente 15 mM; o
 - (iv) de aproximadamente 10 mM.
- 60 11. Solución según cualquiera de las reivindicaciones 1, 2, 5, 6, 8, 9 o 10, en la que el pH no varía más de aproximadamente:
- (i) 0,2 unidades de pH al almacenar a 40°C durante seis meses; o
 - (ii) 0,2 unidades de pH al almacenar a 40°C durante 36 meses.

12. Solución o composición según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, que comprende además un lioprotector, en la que opcionalmente el lioprotector es un azúcar.
- 5 13. Solución o composición según la reivindicación 12, en la que el lioprotector se selecciona de entre manitol, lactosa, sacarosa y trehalosa y combinaciones de los mismos.
14. Solución o composición según la reivindicación 13, en el que el lioprotector es la trehalosa y:
- 10 (i) la trehalosa está presente en una cantidad de aproximadamente 1% a aproximadamente 15% (p/v);
(ii) la trehalosa está presente en una cantidad de aproximadamente 3% a aproximadamente 9%, por ejemplo aproximadamente 9%; o
- 15 (iii) la proporción de proteína morfogenética ósea a trehalosa es de aproximadamente 7×10^{-5} :1 a aproximadamente 1,3:1 (p/p).
15. Solución o composición según cualquiera de las reivindicaciones anteriores que comprende además un antioxidante, seleccionado opcionalmente de entre metionina, ácido ascórbico, alcohol bencílico, glutatión, m-cresol y tioglicerol.
- 20 16. Composición sólida que puede obtenerse por un procedimiento que comprende la etapa que consiste en liofilizar la solución según cualquiera de las reivindicaciones 1, 2, 5, 6, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14 ó 15.
17. Solución según la reivindicación 1 ó 5, que comprende además un estabilizante seleccionado de entre prolina, glicina, valina, isoleucina y leucina, en la que opcionalmente el estabilizador comprende prolina.
- 25 18. Composición sólida que comprende:
- 30 (i) una proteína morfogenética ósea;
(ii) una sal de glicilglicina o una sal de tartrato; y
- (iii) un compuesto seleccionado de entre prolina, glicina, valina, isoleucina, leucina, una sal de prolina, una sal de glicina, una sal de valina, una sal de isoleucina o una sal de leucina.

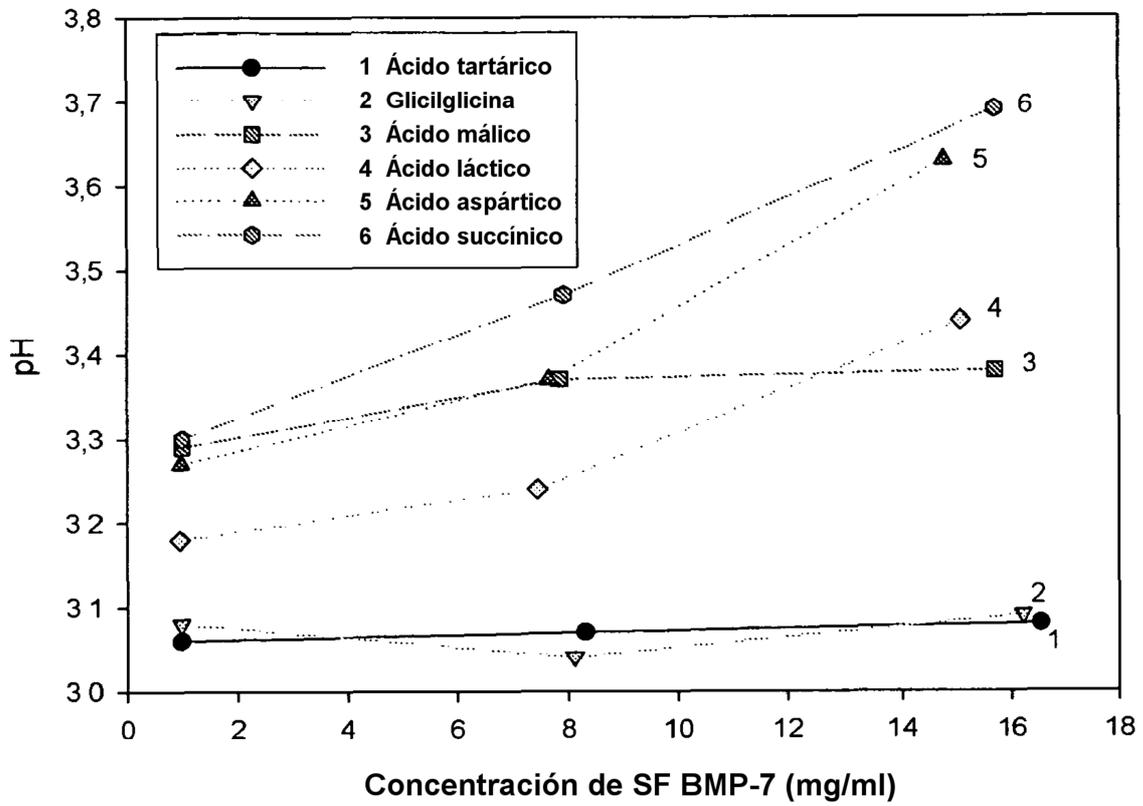


FIG. 1

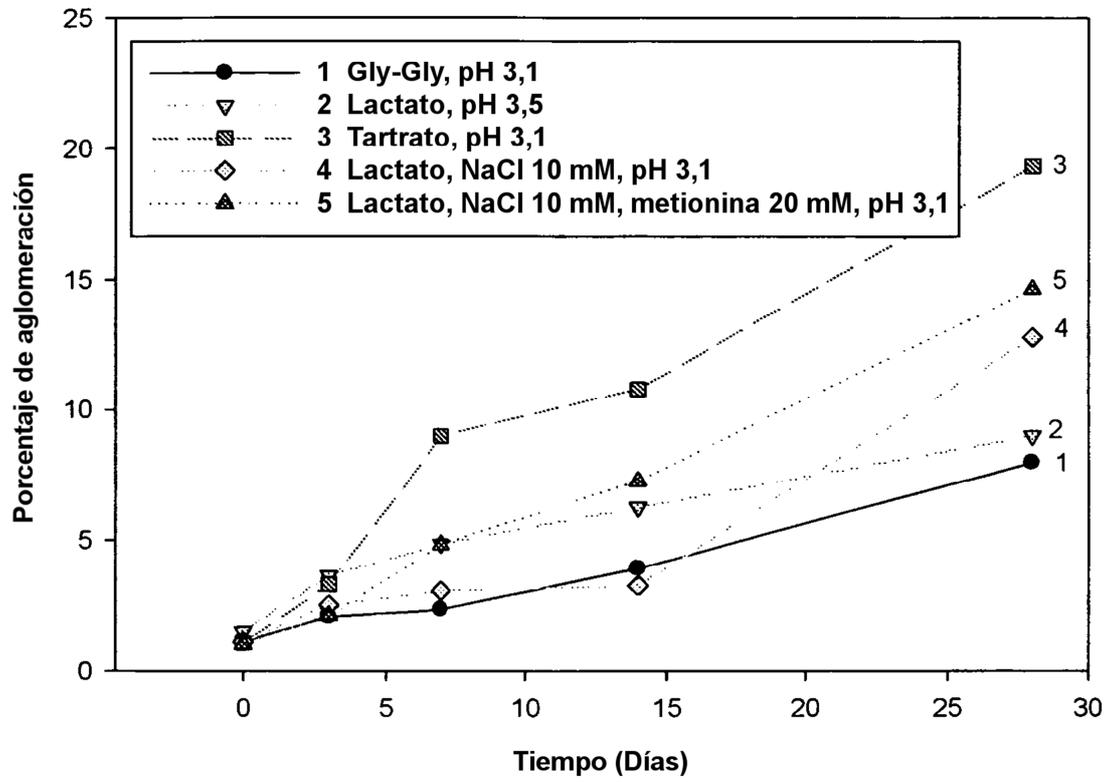


FIG. 2

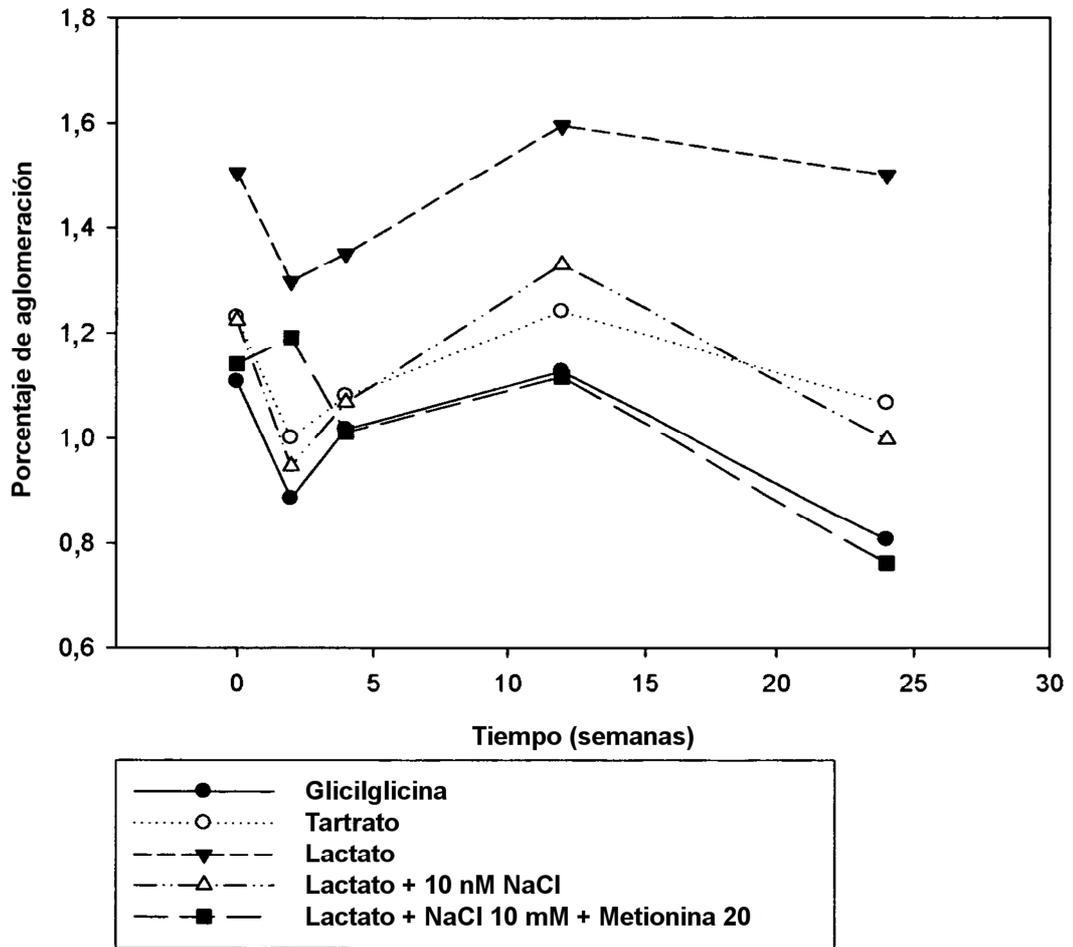


FIG. 3A

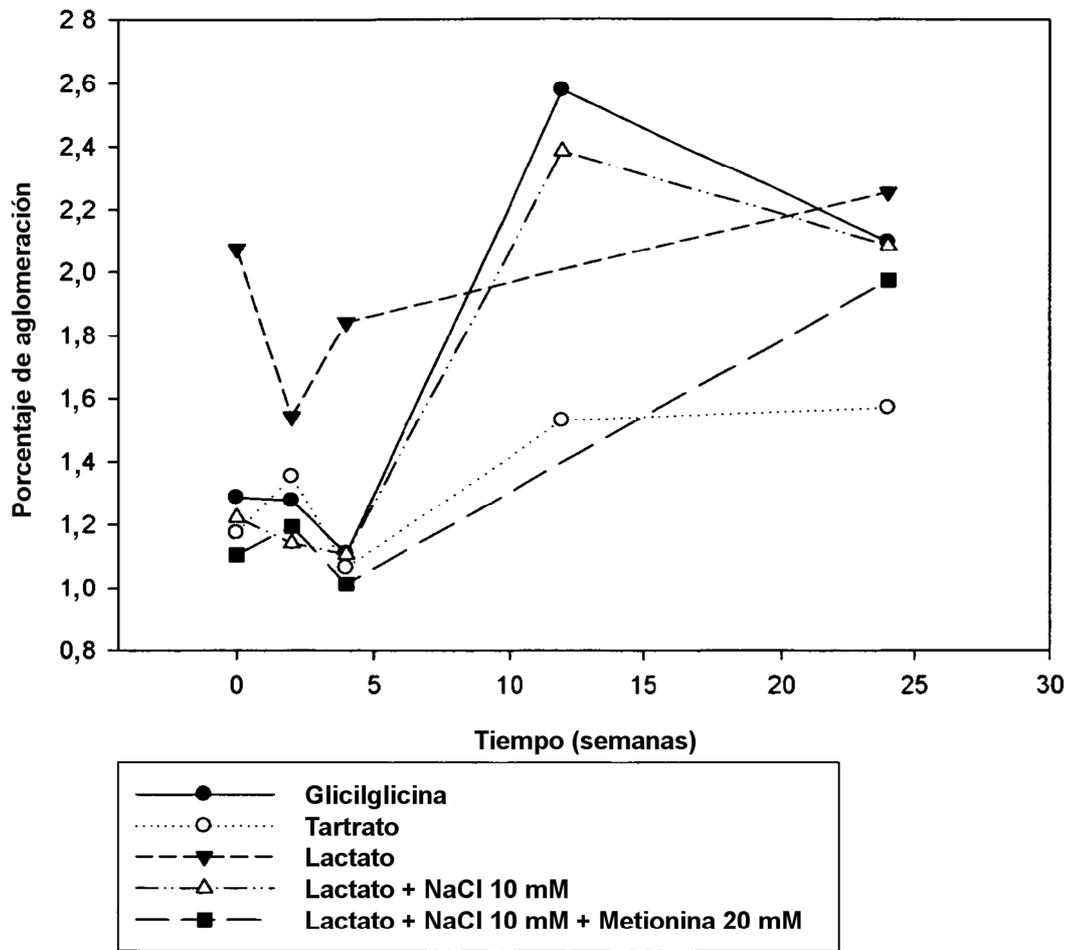


FIG. 3B

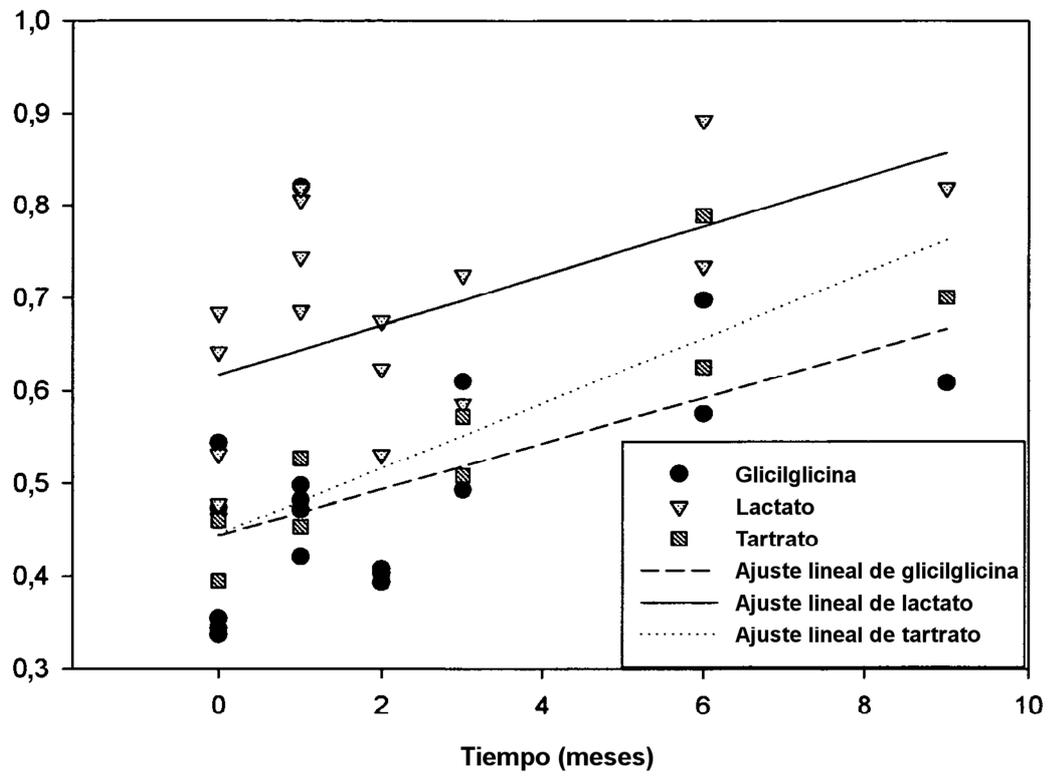


FIG. 4

FIG. 5

BMP-7 Madura Humana (SEC. ID. n° 1)

```

      10          20          30          40
STGSKQRSQN RSKTPKNQEA LRMANVAENS SSDQRQACKK

      50          60          70          80
HELYVSFRDL GWQDWIIAPE GYAAYYCEGE CAFPLNSYMN

      90          100         110         120
ATNHAIVQTL VHFINPETVP KPCCAPTQLN AISVLYFDDS

      130
SNVILKKYRN MVVRACGCH
    
```

FIG. 6

BMP-2 Madura Humana (SEC. ID. n° 2)

```

      10          20          30          40
QAKHKQRKRL KSSCKRHPLY VDFSDVGWND WIVAPPGYHA

      50          60          70          80
FYCHGECPPF LADHLNSTNH AIVQTLVNSV NSKIPKACCV

      90          100         110
PTELSAISML YLDENEKVVL KNYQDMVVEG CGCR
    
```

FIG. 7

BMP-6 Madura Humana (SEC. ID. n° 3)

```

      10          20          30          40          50
SASSRRRQOS RNRSTQSQDV ARVSSASDYN SSELKTACRK HELYVSFQDL

      60          70          80          90          100
GWQDWIIAPK GYAANYCDGE CSFPLNAHMN ATNHAIVQTL VHLMNPEYVP

      110         120         130
KPCCAPTCLN AISVLYFDDN SNVILKKYRN MVVRACGCH
    
```

FIG. 8

BMP-4 Madura Humana (SEC. ID. n° 4)

```

      10          20          30          40
SPKHHSQRAR  KKNKNCRRHS  LYVDFSDVGW  NDWIVAPPGY

      50          60          70          80
QAFYCHGDCP  FPLADHLNST  NHAIVQTLVN  SVNSSIPKAC

      90          100         110
CVPTLSAIS  MLYLDEYDKV  VLKNYQEMVV  EGCGCR
    
```

FIG. 9

BMP-5 Madura Humana (SEC. ID. n° 5)

```

      10          20          30          40          50
NQNRNKSSSH  QDSSRMSSVG  DYNTSEQKQA  CKKHELYVSF  RDLGWQDWII

      60          70          80          90          100
APEGYAIFYC  DGECSFPLNA  HMNATNHAIV  QTLVHLMFPD  HVPKPCCAPT

      110         120         130
KLNAISVLYF  DDSSNVILKK  YRNMVVRSCG  CH
    
```

FIG. 10

GDF-5 Madura Mumana (SEC. ID. n° 6)

```

      10          20          30          40
APLATRQGKR  PSKNLKARCS  RKALHVNFKD  MGWDDWIIAP

      50          60          70          80
LEYEAFHCEG  LCEFPLRSHL  EPTNHAVIQT  LMNSMDPEST

      90          100         110         120
PPTCCVPTRL  SPISILFIDS  ANNVVYKQYE  DMVVEGCGCR
    
```

FIG. 11

GDF-6 Madura Mumana (SEC. ID. n° 7)

```

      10          20          30          40          50
TAFASRHGKR  HGKKSRLRCS  KKPLHVNFKK  LGWDDWIIAP  LEYEAYHCEG

      60          70          80          90          100
VCDFPLRSHL  EPTNHAIQIT  LMNSMDFGST  PPSCCVPTKL  TPISILYIDA

      110         120
GNNVVYKQYE  DMVVEGCGCR
    
```

FIG. 12

GDF-7 Madura Mumana (SEC. ID. n° 8)

```

      10          20          30          40          50
TALAGTRTSQ  GSGGGAGRGH  GRRGRSRCSR  KPLHVDFKEL  GWDDWIIAPL

      60          70          80          90          100
DYEAYHCEGL  CDFPLRSHLE  PTNHAIQITL  LNSMAPDAAP  ASCCVPARLS

      110         120
PISILYIDAA  NNVVYKQYED  MVVEACGCR
    
```