



Industria

SUPERINTENDENCIA

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO



No. 12-153702- -00000-0000

Fecha: 2012-09-07 14:13:00 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI
Act. 411 PRESENTACION Folios: 110

Delegatura de propiedad Industrial

División de Nuevas Creaciones

SOLICITUD
PATENTE DE INVENCION

21. EXPEDIENTE No. _____

54. TÍTULO FORMULACIÓN ESTABLE DE MIA/CD-RAP

51. CLASIFICACIÓN INTERNACIONAL _____

71. SOLICITANTE SCIL TECHNOLOGY GMBH

DOMICILIO Martinsried, Alemania

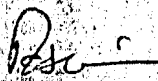
74. APODERADO HUMBERTO RUBIO CAMACHO
COD. 4134

22. BOGOTÁ, D.C., 7 DE SEPTIEMBRE DE 2012

 Industria y Comercio SUPERINTENDENCIA	SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO  No. 12-153702- -00000-0000 Fecha: 2012-09-07 14:13:00 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI Act. 411 PRESENTACION Folios: 110	ivo de radicación
---	--	--------------------------

DIRECCIÓN DE NUEVAS CREACIONES
SOLICITUD FASE NACIONAL –PCT

1	TIPO DE SOLICITUD	☒ Patente de invención ☒ Capítulo I	☐ Patente de Modelo de Utilidad ☐ Capítulo II
2	DATOS SOLICITUD INTERNACIONAL PCT (86)		
Solicitud Internacional No.		PCT/EP2011/056622	Fecha 27/04/2011
Publicación Internacional No.		WO 2011/134979	Fecha 03/11/2011
3	TÍTULO DE LA INVENCIÓN (200 caracteres o espacios máximos)		
FORMULACIÓN ESTABLE DE MIA/CD-RAP			
4	CLASIFICACIÓN INTERNACIONAL (CIP)		
5	SOLICITANTE (S) ☐ Esta persona también es inventor. Para datos adicionales utilizar hoja de información complementaria		
APELLIDOS O RAZÓN SOCIAL		NOMBRE	IDENTIFICACIÓN
SGIL TECHNOLOGY GMBH			
6	DATOS DEL SOLICITANTE		
DIRECCIÓN		No. TELÉFONO	
Fraunhoferstrasse 5,			
CIUDAD	82152 Martinsried	CORREO ELECTRÓNICO	
DEPARTAMENTO/ESTADO		NACIONALIDAD O LUGAR DE CONSTITUCIÓN	Alemania
PAÍS DE RESIDENCIA	Alemania		
7	INVENTOR (ES) Para datos adicionales utilizar hoja de información complementaria		
APELLIDOS		NOMBRES	NACIONALIDAD
1. HELLERBRAND	Klaus		Alemania
2. SIGL	Rainer		Alemania
DIRECCIÓN DE CORREO ELECTRÓNICO:			
8	DATOS INVENTOR (ES)		
PAÍS RESIDENCIA	DEPARTAMENTO/ESTADO	CIUDAD	DIRECCIÓN
1. Alemania		82272 Moorenweis (Eismerszell)	St. - Georg-Strasse 24
2. Alemania		82178 Puchheim	Gröbenbachweg 45
OTRO(S) SOLICITANTE(S) Y/O (OTRO(S)) INVENTOR(ES)			
☐ Los demás solicitantes y/o (demás) inventores se indican en una hoja a continuación.			
9	☐ REPRESENTANTE LEGAL ☒ APODERADO		
APELLIDOS		NOMBRES	IDENTIFICACIÓN
RUBIO CAMACHO		HUMBERTO	C.C.17'192.062 T.P.50.007
DIRECCIÓN	Carrera 7 # 74-64 Oficina 506		No. TELÉFONO 3132408
CIUDAD	Bogotá, D.C.		CORREO ELECTRÓNICO mail@rubiolawyers.com
PAÍS	Colombia		No. RADICACIÓN DE PROTOCOLO DE PODER GENERAL
10	DECLARACIONES DE PRIORIDAD ☒ SI ☐ NO		
(33) PAÍS DE ORIGEN		CÓDIGO PAÍS	(31) NÚMERO
1.Europa		EP	10161160.6
			(32) FECHA (AAAA/MM/DD) 27/04/2010

11	DECLARACIÓN SOBRE USO DE RECURSOS GENÉTICOS O BIOLÓGICOS		
<i>Declaro que el objeto de la presente solicitud de patente fue obtenido a partir de recursos genéticos o biológicos de los que cualquiera de los países miembros de la Comunidad Andina es país de origen.</i>			
☐ SI ☐ NO			
Nota: En caso afirmativo deberá anexar copia del contrato de acceso de recursos genéticos o productos derivados, o certificado o número de registro, expedido por la Autoridad competente.			
12	DECLARACIÓN SOBRE USO DE CONOCIMIENTOS TRADICIONALES		
<i>Declaro que el objeto de la presente solicitud de patente fue obtenido a partir de conocimientos tradicionales de comunidades indígenas, afroamericanas o locales de países miembros de la Comunidad Andina.</i>			
☐ SI ☐ NO			
Nota: En caso afirmativo deberá anexar la licencia o autorización de uso de conocimiento tradicional, o certificado, o número de registro expedido por la Autoridad competente.			
13	REDUCCIÓN DE TASAS		
<i>Declaro que carezco de medios económicos para presentar la solicitud de patente.</i>			
☐ SI ☐ NO			
Nota: En caso de ser persona natural y carecer de medios económicos, y por lo tanto, aplique la reducción de tasas a que se refiere la resolución vigente en tarifas, debe firmar la presente solicitud bajo la gravedad de juramento.			
Micro, pequeñas y medianas empresas ☐			
Universidades públicas o privadas ☐			
Entidades sin ánimo de lucro ☐			
Debe aportar los documentos que se indican en el numeral 17 de anexos			
14	AUTORIZACIÓN DE NOTIFICACIÓN EN LÍNEA ☒ SI ☐ NO		
Manifiesto que he leído y entendido perfectamente los términos y condiciones de uso de medios electrónicos para las notificaciones en línea a través de Internet de los actos administrativos proferidos por la Superintendencia de Industria y Comercio que deben ser notificados personalmente y, en consecuencia, autorizo el servicio de notificación a través de internet.			
15	COMPROBANTE DE PAGO O PAGO ELECTRÓNICO	N° 12-0092056 12-0092057	Fecha 07/09/2012 07/09/2012
16	FIRMA DEL SOLICITANTE, DEL APODERADO O DEL REPRESENTANTE LEGAL		
<i>Junto a cada firma, indicar el nombre del firmante y su calidad (si tal calidad no es obvia al leer el petitorio)</i>			
		HUMBERTO RUBIO CAMACHO	
FIRMA		NOMBRE DEL FIRMANTE	
17192.062		50.007 C.S.J.	
DOCUMENTACIÓN DE IDENTIFICACIÓN		TARJETA PROFESIONAL	
17	ANEXOS		
Documentación Técnica Solicitud Internacional en castellano		Documentación Jurídica	
1. ☒ Descripción N° de folios: 86		9. ☐ Poderes, si fuera el caso.	
2. ☒ Reivindicaciones N° Reivindicaciones: 15		10. ☐ Documento que legalmente pruebe la cesión del inventor al solicitante o a su causante.	
3. ☒ Dibujos y/o figuras N° folios: 11		11. ☐ Copia del contrato de acceso de recursos genéticos o productos derivados, certificado o número de registro, si fuera el caso.	
4. ☒ Resumen.		12. ☐ Copia de la licencia o autorización de Conocimientos Tradicionales, certificado o número de registro, si fuera el caso.	
5. ☐ Certificado de depósito de material biológico si fuera el caso.		13. Reducción de tasas	
6. ☒ Listado de secuencias de nucleótidos y/o aminoácidos en forma digital si fuera el caso.		Micro, pequeñas o medianas empresas	
7. ☐ Arte final 12 x 12.		☐ Copia simple de la declaración de renta del año inmediatamente anterior, o en su defecto prueba documental idónea.	
8. ☐ Anexo formato digital.		☐ Documento de constancia de cumplimiento con lo establecido en la ley 905 de 2004.	
		Universidades públicas o privadas	
		☐ Copia acto de reconocimiento institucional emitido por el Ministerio de Educación	
		Entidades sin ánimo de lucro	
		☐ Copia de registro vigente en Cámara de comercio.	
		☐ Hoja de información complementaria.	
		☐ Otros, especificar	
		14. ☒ Comprobante de pago de la tasa de presentación de la solicitud.	
		15. ☐ Comprobante de pago por reivindicación de prioridad.	
		16. ☐ Comprobante de pago de la tasa por concepto de excedente de palabras en la publicación.	
		17. ☒ Comprobante de pago por reivindicación adicional a 10.	

FORMULACIÓN ESTABLE DE MIA/CD-RAPBreve Descripción de la Invención

La presente invención se relaciona con formulaciones
5 acuosas estables que comprenden al menos 5mg/mL de CD-RAP
y un aminoácido cargado, los aminoácidos preferentemente
tienen una carga neta en un pH entre aproximadamente 6 y
8. Los ingredientes de la formulación preferentemente
proporcionan la estabilidad sobre ciclos repetidos de
10 congelamiento-deshielo. En un aspecto preferido, la
formulación debe usarlo en la terapia, preferentemente
para usarlo en el tratamiento contra trastornos
inflamatorios, preferentemente osteoartritis. Más aún, un
kit que comprende la formulación de la invención se
15 proporciona.

Las proteínas se usan en una amplia gama de
solicitudes en los campos de productos farmacéuticos,
productos veterinarios, cosméticos y otros productos de
consumo, alimentos, suministros, diagnóstico, química
20 industrial y descontaminación. A veces, tales usos han
sido limitados por coacciones inherentes en propias
proteínas o impusieron por el ambiente o medios donde
éstos se usan. Tales coacciones pueden dar como resultado
la baja estabilidad de las proteínas, la variabilidad de
25 desempeño o alto costo. Debido al advenimiento de
biotecnología es posible producir una amplia variedad de
proteínas para solicitudes terapéuticas. Después de su
producción, los productos farmacéuticos protéicos por lo
general se almacenan antes de su uso. Debido a que las
30 proteínas son generalmente más espaciosas y más complejo
que productos farmacéuticos "tradicionales", la
formulación y el procesamiento de productos farmacéuticos

protéicos que son adecuados para el almacenamiento pueden desafiar particularmente. Para revisiones de formulación farmacéutica protéica y diseño de proceso, ver Carpenter et al. (1997), Pharm. Res. 14: 969-975; Wang (2000), Int. J. Pharmaceutics 203: 1 -60; y Tang and Pikal (2004), Pharm. Res. 21: 191-200.

Varios factores pueden considerarse en el diseño de formulaciones y procesos para la producción farmacéutica protéica. De la preocupación primaria es la estabilidad de la proteína a través de algunas o todas etapas de elaboración, embarque y manejo de etapas, que pueden incluir la preparación de la composición, congelación, secado, almacenamiento, embarque, reconstitución, congelar/descongelarse ciclos, y post - almacenamiento de la reconstitución por el usuario final. Otras consideraciones potenciales incluyen la facilidad y la economía de elaboración, manejo y distribución; composición del producto final para administración del paciente; y facilidad de uso por el usuario final, incluyendo solubilidad de la formulación liofilizada mediante reconstitución.

Las formulaciones líquidas pueden satisfacer ciertos objetivos. Las posibles ventajas de formulaciones líquidas incluyen la facilidad y la economía de la elaboración y conveniencia para el usuario final. Con frecuencia, cuando almacenado para polipéptidos de largos periodos son inestables en la solución (Manning et al (1989), Pham. Res. 6: 903-918). En consecuencia, las etapas de procesamiento adicionales se han desarrollado para permitir para una vida en anaquel más larga que incluye el secado, e. g., liofilización. Las formulaciones liofilizadas también pueden proporcionar ciertas ventajas.

El potencial se beneficia de la liofilización incluyen la estabilidad protéica mejorada así como la facilidad y la economía de embarque y almacenamiento. Sin embargo, las composiciones farmacéuticas liofilizadas pueden ser menos
5 convenientes para el usuario final.

Además de la opción de la forma básica de la composición (p.ej, liofilizado, líquido, congelado, etc.), la optimización de una formulación proteínica por lo común implica variar los componentes de la formulación y sus
10 respectivas concentraciones para maximizar la estabilidad protéica. Una variedad de factores puede afectar la estabilidad protéica, incluyendo la fuerza iónica, pH, temperatura, congelar/descongelarse ciclos, fuerzas de corte, congelación, secado, agitación y reconstitución. La
15 inestabilidad protéica puede ser causada por la degradación física (p.ej, desnaturalización, agregación o precipitación) o degradación química (p.ej, deamidación, oxidación o hidrólisis). La optimización de componentes de la formulación y las concentraciones están únicamente
20 basadas en estudios empíricos y/o enfoques racionales al vencimiento de fuentes de inestabilidad.

A veces, en el almacenamiento a largo plazo de composiciones farmacéuticas que contienen polipéptidos, incluyendo formulaciones acuosas y liofilizadas, los
25 polipéptidos activos pueden perderse debido a agregación y/o degradación.

En consecuencia, las prácticas comunes para mejorar la estabilidad polipeptídica pueden encargarse al variar la concentración de elementos con la formulación, o
30 agregando excipientes para modificar la formulación (los Estados Unidos patentan Núm. 5,580, 856 y 6,171,586 y número de la solicitud de la Patente de E.U. US

2003/0202972, US 2003/0180287). US 5,580,856 es una solicitud del prototipo de la cual los agentes podrían agregarse para estabilizar una proteína secada durante o después de la nueva hidratación como polímeros naturales, surfactantes, polisacáridos sulfatados, proteínas y amortiguadores. Sin embargo, aparte de muchas opciones, la patente de E.U. 5,580,856 no muestra qué estabilizador de la nueva hidratación debería agregarse para cual proteína. En consecuencia, mientras el lector experto se elabora consciente de esto muchas opciones, él o ella tendrían que averiguar para su/su proteína las mejores condiciones entre muchas opciones descritas por US 5,580,856. La solicitud de la patente de E.U. 2003/0202972 describe una formulación liofilizada estable de un antianticuerpo her2, donde el estabilizador es el azúcar, trehalosa o un amortiguador. Aún, mientras estos estabilizadores pueden ser útiles para un anticuerpo, éstos no pueden extrapolarse a otras proteínas. La solicitud de la patente de E.U. 2003/0180287 es similar a US 2003/0202972 en que también describe una solución estable de una proteína parecida a una inmunoglobulina, es decir, una proteína que contiene un dominio Fc. El estabilizador puede ser el fosfato de sodio, fosfato de potasio, el sodio o el citrato del potasio, el ácido maléico, acetato de amonio, el tris-amortiguador, acetato, diethaolamine, histidina, la lisina o la cisteína. Entre estos estabilizadores químicamente distintos que podrían seleccionarse por el lector experto, la lisina resultó ser adecuada. Sin embargo, similar con US 2003/0202972, el estabilizador específico es simplemente adecuado para una proteína específica, aquí un dominio Fc que contiene la proteína, y no puede en sí extrapolarse a otra proteína. En

consecuencia, el uso de aditivos no puede extrapolarse de una proteína específica a otra proteína no relacionada. En efecto, el uso de aditivos - al mejorar el almacenamiento - todavía puede dar como resultado polipéptidos inactivos.

- 5 Además, en caso de la liofilización, la etapa de la nueva hidratación puede introducir condiciones que dan como resultado la inactivación del polipéptido por, por ejemplo, agregación o desnaturalización (Hora et al. (1992), Pharm. Res., 9: 33-36; Liu et al. (1991),
10 Biotechnol. Bioeng., 37: 177-184). De hecho, la agregación de polipéptidos es indeseable ya que puede dar como resultado inmunogenicidad (Cleland et al. (1993), Crit. Rev Sistemas del Portador del Fármaco Terapéuticos, 10: 307-377; y Robbins et al. (1987), Diabetes, 36: 838-845).

- 15 El mantenimiento de la actividad biológica durante el desarrollo y la elaboración de productos farmacéuticos depende de la estabilidad inherente de la macromolécula, así como los métodos de estabilización empleados. Un intervalo de métodos de estabilización protéicos existe;
20 incluir adición de "estabilizadores" químicos a la solución acuosa o suspensión de proteína. Por ejemplo, Estados Unidos patentan 4,297,344 describe la estabilización de factores de la coagulación II y VIII, antitrombina III y plasminógeno contra calor aminoácidos
25 agregando seleccionados. Los 4,783,441 evidentes de los Estados Unidos describen un método para estabilizar proteínas sustancias agregando tensoactivas. Los 4,812,557 evidentes de los Estados Unidos describen un método para estabilizar la interleucina 2 al usar la albúmina sérica
30 humana. Congele/descongélase métodos donde la preparación se mezcla con un crioprotector y almacenado en muy bajas temperaturas es otra opción de estabilizar una proteína.

Sin embargo, no todas las proteínas sobrevivirán un ciclo congelar/descongelar. Almacenamiento en cámaras frigoríficas con el aditivo del crioprotector, normalmente el glicerol es una opción adicional. El almacenamiento en la forma de cristal, como se describe en 5,098,893 evidentes de los Estados Unidos también podría elaborarse. En este caso, las proteínas se disuelven en sustancias hidrosolubles o hídricas y con capacidad de hinchamiento que están en el estado amorfo o vítreo. El método más de uso común para la estabilización de proteínas es la liofilización o la liofilización. Siempre que la estabilidad protéica suficiente no pueda lograrse en la solución acuosa, la liofilización proporciona la alternativa más viable. Una desventaja de la liofilización es que requiere el procesamiento sofisticado, lleva mucho tiempo y costoso. Además, si la liofilización no es llevada a cabo cuidadosamente, la mayor parte de preparaciones son al menos parcialmente desnaturalizadas por la congelación y etapas de la deshidratación del método. El resultado es la agregación con frecuencia irreversible de una porción de moléculas protéicas, haciendo una formulación inaceptable para la administración parenteral.

Generalmente hablado, la degradación de proteínas ha sido el pocillo descrito en la literatura, pero no se han descrito el almacenamiento y la solubilidad, en particular, de CD-RAP/MIA (adicionalmente referido como CD-RAP). EL CD-RAP Es una proteína pequeña, soluble secretada de células del melanoma de neoplasia maligna y de condrocitos. Pruebas recientes han identificado al CD-RAP como el prototipo de una pequeña familia de proteínas extracelulares que adoptan vez parecida a un dominio SH3.

Se cree que la interacción entre CD-RAP y epítomos
específicos en proteínas de la matriz extracelulares
regula la unión de células tumorales y condrocitos (Moser
et al. (2002), Célula de Mol Biol. 5:1438-45). Mientras
5 tanto, las proteínas RELACIONADAS CON CD CON RAP se
conocen de US 2002/0103360 y WO 2004/015078. Sin embargo,
ambas solicitudes son silenciosas sobre formulaciones
estables de las proteínas RELACIONADAS CON CD CON RAP,

Hasta ahora, una formulación basada en el liposoma de
10 CD-RAP se conoce de WO 2008/040556. Específicamente, una
composición farmacéutica secada que comprende las
vesículas multilaminares espaciales que contienen al CD-
RAP después de la reconstitución se describe, por lo cual
la proteína CD-RAP se encapsula y/o se entrapa en
15 liposomas para la administración de CD-RAP prolongada tal
que puede permanecer durante un período de tiempo más
largo con el sitio deseado de la acción.

Una función de CD-RAP es que actúa como un factor
quimiotáctico sobre células pluripotenciales
20 mesenquimatosas. Mientras, el CD-RAP no es capaz de
inducir la diferenciación de murino o células
pluripotenciales mesenquimatosas humanas (HMSC), influye
en la acción de proteína morfogenética ósea (BMP)-2 y
factor de crecimiento transformante (TGF) - la beta 3
25 durante la diferenciación de la célula pluripotencial
mesenquimatosas, apoyando el fenotipo chondrogenic al
inhibir la diferenciación osteogénica. Adicionalmente, el
CD-RAP lentifica la expresión génica de osteopontin y la
osteocalcina en BMP-2 trató cultivos de HMSC que inhiben
30 el potencial osteogénico de BMP-2. En caso de condrocitos
primarios humanos el CD-RAP estimula la deposición de la
matriz extracelular, aumentando el contenido

glycosaminoglycan. Por lo tanto, se piensa a ese CD-RAP es un regulador importante durante diferenciación chondrogenic y mantenimiento del cartílago. En consecuencia, se cree que el CD-RAP es un candidato
5 prometedor por la reparación del cartílago. Se desearía por lo tanto para tener formulaciones farmacéuticas disponibles que comprenden al CD-RAP en una suficientemente elevada cantidad que es estable durante un período de tiempo prolongado durante el almacenamiento. De
10 hecho, las formulaciones estables con elevadas concentraciones de CD-RAP permitirían inyecciones del volumen inferiores para pacientes, que reduce efectos secundarios dolor similar debido a la inyección del alto volumen y permite naturalmente el aumento de cada dosis.

15 Además, mientras se conoce en la técnica que las opciones múltiples de agentes estabilizadores protéicos así como agentes que permiten elevada concentración de una proteína al mantenerse la cuadra están disponibles, hasta ahora invención, no se reconoce en la técnica que una
20 formulación que comprende una proteína CD-RAP en elevadas concentraciones podría ser inestable y así requerir la mejora.

Por lo tanto, el problema técnico de la presente invención es cumplir con las necesidades descritas
25 anteriormente.

La presente invención se encarga a estas necesidades y así proporciona como una solución del problema técnico las modalidades acerca de formulaciones así como métodos y usos que aplican estas formulaciones en el tratamiento de
30 pacientes padeciendo de enfermedades que se beneficiarían de la administración de CD-RAP. Estas modalidades se caracterizan y descrito aquí, ilustrado en los Ejemplos y

reflejado en las reivindicaciones.

Debe observarse que como se utiliza aquí, las formas singulares "a", un, y el, incluyen referencias plurales a menos que el contexto claramente indique otra cosa. Así, 5 por ejemplo, la referencia a "un anticuerpo" incluye uno o más de tales diferentes anticuerpos y la referencia "al método" incluye la referencia a etapas equivalentes y métodos conocidos a aquellos de la habilidad común en la técnica que podría modificarse o sustituido para los 10 métodos descritos aquí.

Todas las publicaciones y las patentes citadas en esta descripción se incorporan por referencia en su totalidad. Al grado el material incorporado por referencia contradice o es inconsistente con esta especificación, la 15 especificación reemplazará cualquier tal material.

Al menos que se indique otra cosa, debe entenderse que el término "al menos" que precede a una serie de elementos se refiere a cada elemento en la serie. Los expertos en la técnica reconocerán o serán capaces no de 20 averiguar usar más que experimentación rutinaria, muchos equivalentes con las modalidades específicas de la invención descrita aquí. Tales equivalentes pretenden ser abarcados por la presente invención.

Durante todo esta especificación y las 25 reivindicaciones que siguen, a menos que el contexto requiera otra cosa, la palabra "comprenden", y variaciones tal como "que comprenden" y "que comprende", se entenderá implicar la inclusión de un número entero indicado o etapa o grupo de números enteros o etapas, pero no la exclusión 30 de cualquier otro número entero o etapa o grupo de número entero o etapa. Cuando usado aquí el término "qué comprender" puede ser sustituido con el término

11

"contención" o a veces cuando usado aquí con el término "que tener".

Cuando usado aquí "que comprende" excluye cualquier elemento, etapa o ingrediente no especificado en el
5 elemento de la reivindicación. Cuando usado aquí, "que comprende esencialmente en" no excluye materiales o etapas que no afectan materialmente las características alcalinas y novedosas de la reivindicación. En cada caso aquí cualquier de los términos "que comprender", "que comprende
10 esencialmente en" y "que comprende" puede ser sustituido con cualquiera de los otros dos términos.

Como se utiliza aquí, el término conjuntivo "y/o" entre múltiples elementos mencionados se entiende como abarcando tanto opciones individuales como combinadas. Por
15 ejemplo, donde dos elementos se conjuntan por "y/o", una primera opción se refiere a la aplicabilidad del primer elemento sin el segundo. Una segunda opción se refiere a la aplicabilidad del segundo elemento sin el primer. Una tercera opción se refiere a la aplicabilidad de los
20 primeros y segundos elementos conjuntamente. Se entiende que cualquiera de estas opciones se incluye dentro el significado, y por lo tanto satisface el requerimiento del término "y/o" como se utiliza aquí. La aplicabilidad concomitante de más de una de las opciones también es
25 entendida incluirse dentro el significado, y por lo tanto satisfacer el requerimiento del término "y/o" como se utiliza aquí.

Varios documentos se citan durante todo el texto de esta especificación. Cada uno de los documentos citados
30 aquí (incluyendo todas las patentes, solicitudes de patente, publicaciones científicas, las especificaciones del fabricante, instrucciones, etc.), o supra o infra, se

incorpora aquí como referencia en su totalidad. Nada aquí debe interpretarse como una admisión que la invención no tiene derecho a antedatar tal descripción en virtud de la invención previa.

5 Los inventores de la presente con el objetivo de proporcionar una formulación que tienen una elevada cantidad de CD-RAP a fin de permitir el volumen inferior cuando se inyecta en pacientes que lo necesita para reducir efectos secundarios el dolor similar debido a la
10 inyección del alto volumen reconoció que una proteína CD-RAP puede ser inestable en elevadas concentraciones y también puede ser inestable sobre un período prolongado de almacenamiento.

Ese que es tan, los inventores de la presente han
15 observado la cierta inestabilidad de proteínas de CD-RAP durante sus estudios con el objetivo de proporcionar una formulación muy concentrada, estable y, así, han apuntado al mejoramiento de esta observación indeseada. En consecuencia, éstos apuntados a CD-RAP que se concentra al
20 mantenerlo en solución, es decir, en una etapa disuelta. En hacer tan, éstos tienen opciones múltiples y alternativas disponibles, sin, sin embargo, cualquier indicación que cualquier de ellos sería adecuado para solucionar el problema objetivo.

25 "La etapa disuelta" significa que la proteína CD-RAP, preferentemente en una concentración de al menos 5mg/mL de CD-RAP, está en la solución, es decir, (dis) solucionado y/o dispersado directamente en la solución acuosa (es decir, en la fase acuosa) de la formulación.
30 Preferentemente, la proteína CD-RAP es homogéneamente (dis) solucionada y/o dispersada. Homogéneamente significa que la cantidad de la proteína CD-RAP que es (dis)

solucionado y/o dispersado en la formulación acuosa estable casi regularmente, preferentemente regularmente, se distribuye en la formulación acuosa de modo que la concentración ("c") de la cantidad de la proteína CD-RAP
5 ("n" en caso de la masa molar o "m" en caso de la masa) sea casi idéntica, preferentemente idéntica en (o durante todo) el tomo ("v") de la solución acuosa, es decir, $c=n/v$ o $c=m/v$, respectivamente, es casi constante, preferentemente constante. Preferentemente no hay ningún
10 gradiente de concentración dentro de la formulación.

En consecuencia, la formulación acuosa estable de la presente invención que comprende una proteína CD-RAP puede preferentemente considerarse como una solución acuosa, donde un CD-RAP directamente se disuelve y/o se dispersa
15 en esa parte.

Más preferentemente, la formulación acuosa estable de la presente invención puede considerarse como un acuoso al menos 5mg/mL de la proteína CD-RAP y un aminoácido cargado. Esto significa que la formulación se basa en una
20 solución acuosa, donde al menos 5mg/mL de la proteína CD-RAP se disuelve y/o dispersado conjuntamente con al menos el aminoácido cargado.

Alternativamente, la formulación acuosa estable de la presente invención puede más preferentemente considerarse
25 como una formulación estable basada en una solución acuosa, la formulación que comprende al menos una concentración (el peso/volumen) de 5mg/mL de la proteína CD-RAP y un aminoácido cargado.

Una "solución" es una mezcla homogénea del uno o dos
30 o más sustancias/componentes. En tal mezcla, un soluto (en la presente invención una proteína CD-RAP, preferentemente al menos 5mg/mL de la proteína CD-RAP) se disuelve (como

se describe anteriormente) en otra sustancia (en la presente invención preferentemente una formulación acuosa), también conocido como el solvente.

Considerando el mayor que, la proteína CD-RAP
5 preferentemente heterogéneamente no se disuelve y/o se dispersa en la solución acuosa. El término "disuelto del estado" también incluye esto la proteína CD-RAP preferentemente esencialmente no se emulsiona, o más preferentemente no se emulsiona en absoluto en la solución
10 acuosa.

También, el término "disuelto del estado" incluye esto la proteína CD-RAP preferentemente esencialmente no se encapsula y/o se entrampa (preferentemente menos que el 2%, el 1%, o el 0,5% de la proteína CD-RAP puede
15 encapsularse y/o entramparse), o más preferentemente no encapsulado y/o entrampado en absoluto, p.ej, en liposomas, liposomas multilaminares o lo similar.

En consecuencia, en un aspecto preferido, la presente invención abarca una cuadra acuosa esencialmente liposoma
20 libre (preferentemente menos que el 2%, el 1%, o liposomas del 0,5%), preferentemente liposoma libre, formulación que comprende al menos 5mg/mL de la proteína CD-RAP y un aminoácido cargado.

En un aspecto más preferido alternativo, la presente
25 invención abarca una formulación acuosa estable que comprende al menos 5mg/mL de la proteína CD-RAP y un aminoácido cargado, donde la proteína CD-RAP esencialmente no se contiene (preferentemente menos que 2, 1, o el 0,5%), preferentemente no se contiene (encapsulado y/o
30 entrampado) en liposomas.

En efecto, hay muchos modos que una proteína puede ser inestable. Por ejemplo, la inestabilidad protéica

podría ser causada por la agregación protéica, pero también por la inestabilidad química debido a desaminación, oxidación, rotura del enlace disulfuro y formación, hidrólisis, succinimidation, entrecruzamiento del no disulfuro, deglycosylation o "colorante enzimático" (reacción de Maillard) o cualquier combinación de estos fenómenos; ver, por ejemplo, a Wang et al. (1999), Intervalo. J. Pharm. 185: 129-188) y Figura 1. Los parámetros Más aún, fisicoquímicos como la temperatura, valor del pH, adsorción de superficie, sales, iones metálicos, agentes quelantes, fuerzas físicas como fuerzas de corte, proteína denaturants, solventes no acuosos, concentración proteica, fuente y pureza de la proteína, proteína morphism o presión pueden influir en la estabilidad protéica.

Aún, que muchos factores que pueden influir en la estabilidad protéica que muchas medidas podrían obtenerse para estabilizar una proteína. Por ejemplo, una proteína puede ser internamente (al cambiar aminoácidos) o externamente estabilizado. La estabilización externa podría lograrse por agentes quelantes, iones metálicos, agentes reductores, polímeros, glicoles/polioles de polietileno, albúmina sérica, surfactantes, azúcares y polioles, ácidos grasos y fosfolípidos, aminoácidos, amortiguadores, etc.; ver, por ejemplo, a Wang, Y y Hanson M (1988), J. Sci parenteral. & Tecnología, 42, Suplemento: 4-26; Wang et al. (1999), Intervalo. J. Pharm. 185: 129-188, y Figura 2. En la suma, para estabilizar una proteína CD-RAP en una formulación, el experto tendría tienen muchas opciones disponibles.

En el caso presente, los inventores observaron que la proteína CD-RAP mostró la agregación. Muchos diferentes

factores pueden causar la agregación de una proteína en una formulación proteínica. Los procedimientos de almacenamiento y purificación comunes pueden exponer formulaciones proteínicas a condiciones y componentes que hacen que la proteína agregue. Por ejemplo, las proteínas en una formulación proteínica pueden agregar a consecuencia de cualquiera o más de lo siguiente: almacenamiento, exposición a elevadas temperaturas, el pH de la formulación, la fuerza iónica de la formulación y la presencia de ciertos surfactantes (p.ej, polisorbato 20 y polisorbato 80) y agentes emulsionantes. De forma similar, las proteínas pueden agregar al ser expuesto al esfuerzo cortante, tal como, reconstituyendo un concentrado protéico liofilizado en la solución, purificación del filtro una muestra protéica, congelar descongelando, agitación o transferir una solución de proteína mediante jeringa. La agregación también puede ocurrir a consecuencia de interacciones de moléculas polipeptídicas en la solución y en las interconexiones de aire líquido dentro de viales de almacenamiento. Los cambios estructurales pueden ocurrir en polipéptidos adsorbidos a interconexiones líquidas por el aire y sólidas y líquidas durante compresión o extensión de las interconexiones que resultan a partir de agitación durante el transporte. Tal agitación puede hacer que la proteína de una formulación agregue y precipite por último con otras proteínas adsorbidas.

Además, la exposición de una formulación proteínica para encenderse puede hacer que la proteína agregue. La presente invención así proporciona formulaciones que permiten elevadas concentraciones de CD-RAP y que reducen la agregación de proteínas. Sin estar obligada por la

teoría la reducción de la agregación protéica se logra controlando uno o más de los mecanismos de la agregación anteriormente mencionados. Esto puede resultar en, por ejemplo, estabilidad del producto mejorada y mayor
5 flexibilidad en condiciones de almacenamiento y procesos de elaboración.

Específicamente, los inventores de la presente descubrieron que de muchos aminoácidos de agentes analizados que transportan una carga neta en un pH entre
10 aproximadamente 6 y aproximadamente 8 son útiles para estabilizar una proteína CD-RAP en elevada concentración por, entre otras cosas, regulando la solubilidad protéica y/o inhibiendo la agregación protéica. Cuando referido aquí un aminoácido lo significan preferentemente para ser
15 un L-aminoácido. Menos preferido es un D-aminoácido. Preferentemente el aminoácido es la L-histidina, L-arginina, el ácido L-glutámico o una sal de lo mismo; preferentemente la sal es cloruro, fosfato, acetato o sulfato.

20 En consecuencia, la invención se basa, al menos parcialmente, en el descubrimiento que las formulaciones que comprenden al menos 5mg/mL de CD-RAP y un aminoácido cargado o salan de lo mismo, preferentemente la sal son cloruro, fosfato, acetato o sulfato, más preferentemente,
25 además, un amortiguador, un disacárido, un agente volumétrico, y opcionalmente surfactante se vuelve suficientemente estable para el almacenamiento a largo plazo y/o uno o más se congelan/descongelan ciclos. La formulación de la invención tiene muchas ventajas a las
30 formulaciones almacenadas en un buffer del patrón. En un aspecto, la formulación comprende elevadas concentraciones proteicas de CD-RAP, p.ej, 30mg/mL o más.

Sorprendentemente, a pesar de elevada concentración de la proteína, la formulación tiene la agregación mínima y puede almacenarse al usar diversos métodos y formas, p.ej, congelación, sin efectos deletéreos que podrían esperarse con elevadas formulaciones proteínicas.

En algunas modalidades menos preferidas, las formulaciones de la invención no requieren excipientes, tal como, por ejemplo, surfactantes y sistemas de amortiguación, que se usan en formulaciones tradicionales para estabilizar proteínas en la solución. Además, las formulaciones descritas aquí se prefieren sobre formulaciones convencionales porque éstos han disminuido inmunogenicidad debido a la falta de agentes adicionales necesarios para la estabilización protéica.

Así, la presente invención concierne a una formulación líquida, preferentemente una formulación líquida estable que sorprendentemente permite el almacenamiento a largo plazo de CD-RAP el análogo polipeptídico o biológicamente activo de lo mismo que tiene una secuencia aminoacídica que comparte homología de la secuencia de al menos el 63% con el cuatro esqueleto de la cisteína de CD-RAP, aminoácidos 12 a 107 de SEQ ID No. 1 como se describe a continuación en una concentración de al menos 5mg/mL, preferentemente al menos 7.5mg/mL, más preferentemente al menos 10mg/mL, incluso más preferentemente al menos 15mg/mL, particularmente preferido al menos 20mg/mL, más particularmente preferido al menos 25mg/mL, incluso más particularmente preferido al menos 30mg/mL y un aminoácido cargado o sal de lo mismo, preferentemente cloruro, fosfato, acetato o sulfato. Esta formulación es útil, en parte, porque es más conveniente usar para el paciente, ya que el polipéptido de CD-RAP de

esta formulación es muy concentrado para reducir efectos secundarios dolor similar debido a la inyección del alto volumen. Más aún, la solicitud de la formulación a un paciente bajo el bajo nivel de la presión hidráulica
5 dinámica con la inyección intraarticular potencia chondrogenesis.

La formulación de la invención (a veces también referido a aquí como "la composición de la materia" o "composición") puede estar preferentemente en diversos
10 estados físicos como líquido, formulaciones congeladas, liofilizadas, liofilizadas, secadas por aspersión y reconstituidas, con preferirse líquido y liofilizado. Preferentemente, la formulación tiene un pH de 6,0 y más, adicionalmente preferentemente entre 5,5 y 9,0, más
15 preferentemente la formulación tiene un pH entre 6,0 y 8,0, adicionalmente más preferentemente entre 6,5 y 7,6, con mayor preferencia entre 7,0 y 7,5.

"La formulación líquida" como se utiliza aquí se refiere a una composición de materia que se encuentra como
20 un líquido, caracterizado por la libre circulación de las moléculas constitutivas entre sí, pero sin la tendencia de separar a temperatura ambiente. Las formulaciones líquidas incluyen líquidos acuosos y no acuosos, con formulaciones acuosas preferirse. Una formulación acuosa es una
25 formulación donde el solvente es el agua. La disolución del polipéptido de CD-RAP en la formulación puede ser homogénea o heterogénea, con preferirse homogéneo como se describe anteriormente.

Cualquier líquido no acuoso adecuado puede emplearse
30 a condición de que proporcione la estabilidad a la formulación de la invención. Preferentemente, el líquido no acuoso es un líquido hidrofílico. Los ejemplos

ilustrativos de líquidos no acuosos adecuados incluyen:
 glicerol; sulfóxido del dimetilo (DMSO);
 polidimetilsiloxano (PMS); etilenglicoles, como
 etilenglicol, dietilenglicol, trietilenglicol,
 5 polietilenglicol ("PEG") 200, PEG 300 y PEG 400; y
 propilenglicoles, como glicol de dipropileno, tripropylene
 glicol, polipropilenglicol ("PPG") 425 y PPG 725.

"La formulación líquida aqueous/non-aqueous
 mezclada" como se utiliza aquí se refiere a una
 10 formulación líquida que contiene una mezcla de agua y una
 composición líquida adicional.

Cuando usado aquí una "formulación" es una mezcla de
 un polipéptido de CD-RAP (es decir, el fármaco/sustancia
 activo) y sustancias químicas adicionales y/o aditivos
 15 requeridos para un producto medicinal que está
 preferentemente en un estado líquido. Una formulación de
 la invención incluye una formulación farmacéutica. El
 término "formulación farmacéutica" se refiere a
 formulaciones que están en tal forma para permitir a la
 20 actividad biológica de los ingredientes activos ser
 efectiva, y, por lo tanto, pueden administrarse a un
 paciente para el uso terapéutico como se describe aquí.

La preparación de la formulación incluye el proceso
 las donde diferentes sustancias químicas, incluyendo el
 25 fármaco activo, se combinan para producir un producto
 medicinal final como una composición farmacéutica. El
 fármaco activo de la formulación de la invención es un
 polipéptido de CD-RAP. El término "polipéptido" se puede
 usar aquí de modo indistinto con el término "proteína" y,
 30 como se utiliza aquí, abarca un péptido, un polipéptido,
 una proteína y una proteína de fusión. Las proteínas
 pueden elaborarse por métodos recombinantes o sintéticos.

En ciertas modalidades, la proteína CD-RAP para formularse es esencialmente pura y/o esencialmente homogénea (es decir, sustancialmente libre de contaminar proteínas, etc.). El término "esencialmente puro" proteína
 5 significa una composición que comprende al menos aproximadamente el 80% preferentemente el 90% en peso de la fracción protéica, preferentemente al menos aproximadamente el 95% en peso de la fracción protéica, más preferentemente el 97% en peso de la fracción protéica
 10 o con mayor preferencia el 98% en peso de la fracción protéica. El término "esencialmente homogéneo" proteína significa una composición que comprende al menos aproximadamente el 99% en peso de la fracción protéica, excluyendo la masa de diversos estabilizadores y agua en
 15 la solución.

El polipéptido de CD-RAP de la formulación de la invención se conoce en la técnica (ver EP-B1 710 248 o EP-B1 1 146 897) y/o descrito aquí. El CD-RAP (El cartílago derivó el ácido retinoico proteína sensible) el
 20 polipéptido aplicado en las formulaciones de la invención es el polipéptido de CD-RAP, también MIA nombrado (actividad inhibitoria del melanoma), OTOR (fibrocyte proteína derivada, FDP, MIA - similar, MIAL) y TANGO 130 que pertenece a una clase de proteínas secretadas como se
 25 describe en Bosserhoff et al. (2004), Gene Expr. Patrones. 4: 473-479; Bosserhoff y Buettner (2003), Biomateriales 24: 3229-3234; Bosserhoff et al. (1997), Dev. Dyn. 208: 516-525; WO 00/12762; WO 2004/015078; EP-B1 710 248; US 2002/0103360; o EP-B1 1 146 897). La proteína CD-RAP
 30 aplicada en la formulación de la invención es preferentemente una proteína CD-RAP humana recombinante (rh CD-RAP).

Se prefiere también que el polipéptido de CD-RAP de la formulación de la invención es un polipéptido que comprende o que tiene la secuencia madura de CD-RAP (SEQ ID No. 1) y fragmentos funcionales o variantes de lo mismo, b) un polipéptido que tiene al menos el 63%, más preferentemente el 70%, incluso más preferentemente el 80%, adicionalmente preferentemente el 90%, homología de la secuencia aminoacídica con mayor preferencia del 95% con el cuatro esqueleto de la cisteína de CD-RAP, aminoácidos 12 a 107 de SEQ ID No. 1, o c) un polipéptido que tiene cualquiera de las secuencias genéricas 1 a 3 definidos aquí (SEQ ID Núm. 2, 3 y 4). Una variante de CD-RAP es la proteína que tiene SEQ ID NO: 4 o una forma madura de lo mismo como se describe en WO 2004/015078 o la proteína que tiene SEQ ID NO.14 o una forma madura de lo mismo como se describe en US 2002/0103360.

El término "por ciento (%) homología de la secuencia aminoacídica" con secuencias de CD-RAP de aspecto identificadas aquí se define como el porcentaje de residuos aminoacídicos en una secuencia candidata que son idénticos con los residuos aminoacídicos en la secuencia de CD-RAP, después de alinear las secuencias e introducir separaciones, si es necesario, para lograr la identidad de secuencia del por ciento máxima, y no tomar en cuenta cualquier sustitución conservadora como parte de la identidad de secuencia. La alineación con objetivos de determinar la identidad de la secuencia aminoacídica del por ciento puede lograrse de diversos modos que se incluyen dentro de la habilidad en la técnica, por ejemplo, al usar el software en público disponible como BLAST, SE ALINEAN, o software Megalign (DNASTAR). Los expertos en la técnica pueden determinar que los

parámetros adecuados para medir la alineación, incluyendo cualquier algoritmo tenían que lograr la alineación máxima sobre las de cadena completa de las secuencias que se comparan.

- 5 Los fragmentos funcionales que tienen la misma función biológica que el CD-RAP preferentemente tiene una longitud de al menos 20, en particular, al menos 40 y más preferentemente al menos 50, con mayor preferencia 80 aminoácidos contiguos de la secuencia mostrada en SEQ ID
- 10 No. 1. Preferentemente, los fragmentos funcionales comprenden los aminoácidos de la posición 1 a 50, 1 a 70, 1 a 80, 20 a 80, 20 a 107 de SEQ ID No 1.

Secuencia madura de CD-RAP (SEQ ID No. 1):

GPMPKLADRKLCADQEC SHPISMAVALQDYMAPDCRFLTIHRGQVVYVFSKLKGRGRL

15 FWGGSVQGDYYGDLAARLGYPSSIVREDQTLKPGKVDVKTD KWDFYCQ

Secuencia genérica 1 (SEQ ID No. 2):

C X4 C X17 C X12 V X 11-13 W X7-18 F X4 V X21 C X

Secuencia genérica 2 (SEQ ID No. 3)

K X C X D X E C X11 D X3 P D C X12 V X2 K L X7-9 W Xg de S

20 X5-13g de Y F P X3 V X18 D F X C X

Secuencia genérica 3 (SEQ ID No. 4):

K X C X D X2 C X8 A X2 D X3 P D C R F X5g of X V X5 K L X7
W Xg de S V X12g de Y F P X22 D F X C Q;

- donde "X" en cada ocurrencia indistintamente
- 25 representa cualquier aminoácido y la cantidad en la letra minúscula indica la cantidad de cualquier aminoácido. Preferentemente, "X" indistintamente representa un aminoácido de origen natural y, en particular, A, R, N, D, C, Q, E, G, H, yo, L, K, M, F, P, S, T, W, Y o V. "X"
- 30 también puede representar unos ácidos amino no estándar como lanthionine, ácido 2-aminoisobutyric, dehydroalanine, ornitina, citrulline, alanina de la beta o norleucina. Por

supuesto, las modificaciones postradutoriales comúnmente conocidas en la técnica también son previstas. Así, un polipéptido de CD-RAP de la invención puede ser postraductorialmente modificado.

- 5 Una proteína CD-RAP aplicada en la formulación de la invención puede expresarse de ADN genómico intacto o truncado o ADNc o de DNAs sintético en células hospederas procarióticas o eucarióticas. Las proteínas pueden aislarse de los medios de cultivo o cuerpos de inclusión
- 10 y/o nueva vez para formar composiciones activas biológicas. Ver p.ej. EP-B1 710 248 y Loughheed et al. (2001), Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A 98: 5515-5520 para protocolos ejemplificantes para purificación proteínica recombinante de CD-RAP. La descripción detallada de cómo
- 15 analizar la actividad (p.ej chondrogenesis) de tales proteínas aisladas se describe en Tscheudschilsuren et al. (2005), Exp. Res celular. 1-10; o Stoll et al. (2003), Sci Protéico. 12: 510-519). Un bioensayo para la inducción del cartílago se describe en el ejemplo 2 a 5 en EP-B1 1 146
- 20 897. Los bioensayos adicionales se describen infra y en el Ejemplo 7 y 8.

Los métodos de manipular genéticamente células para producir polipéptidos son conocidos en la técnica. Ver, p.ej, Ausubel et al., editores (1990), Protocolos Actuales

25 en Biología molecular (Wiley, Nueva York). Tales métodos incluyen ácidos nucleicos de introducción que codifican para y permiten la expresión del polipéptido en células hospederas vivas. Estas células hospederas pueden ser células bacterianas, células fúngicas, o, preferentemente,

30 células de animal cultivadas en el cultivo. Las células hospederas bacterianas incluyen, entre otras cosas, células de *Escherichia coli*. Los ejemplos de cepas de *E.*

coli adecuadas incluyen: HB101, DH5a, GM2929, JM109, KW251, NM538, NM539 y cualquier cepa de E. coli que deje de escindir DNA ajeno. Las células hospederas fúngicas que pueden usarse incluyen, entre otras cosas, Saccharomyces cerevisiae, Pichia pastoris y células de Aspergillus. Unos ejemplos de líneas celulares de animal que pueden usarse son CHO, VERO, BHK, HeLa, Porque, MDCK, 293, 3T3, y WI38. Las nuevas líneas celulares de animal pueden ser establecidas al usar métodos conocidos por los expertos en la técnica (e. g., por transformación, infección viral y/o selección). Opcionalmente, el polipéptido puede ser secretado por las células hospederas en el medio.

Los métodos para la purificación polipeptídica como el fraccionamiento en una columna del intercambio iónico, precipitación de etanol, HPLC de fase inversa, cromatografía en sílice, cromatografía en la heparina SEPHAROSSET, cromatografía en un anión o resina del intercambio catiónico (como una columna del poliácido aspártico), cromatografía en SDS-PAGE y precipitación de sulfato de amonio pueden utilizarse según la necesidad. Una proteína CD-RAP aplicada en la formulación de la invención puede expresarse y purificado como se describe en los Ejemplos de EP-B1 1 697 523.

En algunas modalidades, la concentración de una proteína CD-RAP en una formulación de la invención es al menos 5mg/mL, preferentemente al menos 7.5mg/mL, más preferentemente al menos 10mg/mL, incluso más preferentemente al menos 15mg/mL, particularmente preferida al menos 20mg/mL, más particularmente preferido al menos 25mg/mL, incluso más particularmente preferido al menos 30mg/mL.

En algunas modalidades, la concentración del

polipéptido de CD-RAP en una formulación de la invención se selecciona de los intervalos que siguen: de aproximadamente 5mg/mL hasta aproximadamente 10mg/mL, de aproximadamente 10mg/mL hasta aproximadamente 20mg/mL, de
 5 aproximadamente 15mg/mL hasta aproximadamente 25mg/mL, de aproximadamente 20mg/mL hasta aproximadamente 30mg/mL, o de aproximadamente 5mg/mL hasta aproximadamente 30mg/mL.

En un aspecto preferido, la formulación de CD-RAP, particularmente la formulación acuosa estable de la
 10 invención no comprende liposomas y / o material de la matriz. Preferentemente, la formulación de CD-RAP de la invención no comprende liposomas y / o material de la matriz seleccionado del grupo de ácido hialurónico, alginato, colágeno, heparina, fibrina, fibrinogen, hueso
 15 desmineralizado, derivados polilácticos-coglycolid y/o polilácticos-coglycolid o combinaciones de lo mismo. Más preferentemente, la formulación de CD-RAP no contiene una bicapa lipídica.

En un aspecto preferido adicional la proteína CD-RAP
 20 no se comprende en una concentración de incluyendo 1-4mg/mL, 1.0mg/mL, 1.5mg/mL, 2.0mg/mL, 2.5mg/mL, 3.0mg/mL, 3.5mg/mL, 4.0mg/mL en un arginine/H3PO4, preferentemente en una concentración del 350-420mM. Más preferentemente, la proteína CD-RAP no se comprende en una concentración de
 25 1.15mg/mL o 3mg/mL en 350 mM de o 420 mM del pH arginine/H3PO4 7.5.

Cuando usado aquí, se entiende que el término "sobre" significa que puede haber variación en la concentración de una proteína CD-RAP de la formulación descrita que puede
 30 ser al 5%, el 10%, el 15% o hasta e incluyendo el 20% del valor determinado. Por ejemplo, si una formulación tiene sobre 5mg/mL del polipéptido de CD-RAP, se entiende que

esto significa que una formulación puede tener entre 3 a 7mg/mL, más preferentemente entre 4 a 6mg/mL. Thus, como se utiliza aquí, un intervalo de concentración que se define como "X a Y" compara con un intervalo que se define como "entre X y Y". Ambos intervalos de tiempo específicamente incluyen el límite superior y también el límite inferior. Esto significa que por ejemplo un intervalo "5mg/mL a 10mg/mL" o entre "5mg/mL a 10mg/mL" incluye una concentración de 5, 6, 7, 8, 9, y/o 10mg/mL.

Una formulación "estable" es la que donde la proteína en esa parte esencialmente mantiene su estabilidad física y/o estabilidad química y/o actividad biológica mediante almacenamiento y/o no muestra sustancialmente ningunos signos de agregación, precipitación y/o desnaturalización comparado con una muestra control, preferentemente mediante el examen visual de color y/o claridad, o como se cuantifica por la luz ultravioleta dispersarse o por la cromatografía de exclusión de tamaños. Diversos métodos analíticos adicionales para medir la estabilidad protéica están disponibles en la técnica y se revisan en Administración del fármaco Peptídica y Protéica, 247-301, Vincent Lee Ed, Marcel Dekker, Inc., Nueva York, Nueva York, Piqueras. (1991) y Jones, A. Adv. Rev de la Administración del fármaco 10: 29-90 (1993), por ejemplo.

Preferentemente, se entiende que el término "cuadra" con respecto a la formulación de la invención significa que el polipéptido de CD-RAP de la formulación no pierde más del 15%, o más preferentemente el 10%, o incluso más preferentemente el 5%, y con mayor preferencia el 3% de su actividad biológica durante el almacenamiento con relación a la actividad del polipéptido de CD-RAP al principio de almacenamiento y/o durante o después del congelar

descongelando. La actividad biológica de CD-RAP puede determinarse mediante, por ejemplo, el bioensayo para la inducción del cartílago se describe en el ejemplo 2 a 5 en EP-B1 1 146 897. Otros bioensayos son el ensayo de
5 invasión descrito en Stoll et al., (2006), Biol. Chem., volumen 387, pps 1601-1606 o en Ejemplo 7 y 8.

"Durante el almacenamiento," como se utiliza aquí, significa una formulación que una vez preparó, inmediatamente no se usa; más bien, siguiente su
10 preparación, es envasado para el almacenamiento, en una forma líquida, en un estado congelado, o en una forma secada para la reconstitución posterior en una forma líquida u otra forma.

"Los ciclos del congelar-deshielo repetidos"
15 incluyen esto la formulación de la invención se somete a uno o más ciclos del congelar-deshielo, p.ej, un, dos, tres, cuatro, cinco o más ciclos del congelar-deshielo. Sin embargo, como se describe aquí y mostrado en los Ejemplos, la formulación de la invención permanece estable
20 bajo ciclos del deshielo libre repetidos. En consecuencia, el polipéptido de CD-RAP es preferentemente estable bajo el repetido (un, dos, tres, preferentemente cuatro, cinco o más) ciclos del congelar-deshielo, preferentemente el ciclo del congelar-deshielo es así: 5°C a-25°C,
25 refrigeración y tasa de calentamiento 1.0 °C/min con una etapa isotérmica de 15 minutos entre cada ciclo. Sin limitaciones teóricas, el ciclo del congelar-deshielo que preferentemente se aplica en el contexto de la invención simula la tensión helada que puede ocurrir durante la
30 congelación de grandes cantidades de la proteína disuelta. En consecuencia, ya que la formulación de la invención resultó ser capaz de CD-RAP que mantiene establemente en

la solución durante ese ciclo del congelar-deshielo, la formulación de la invención es superior y tiene propiedades ventajosas.

Los agregados pueden formarse durante el
5 almacenamiento, por ejemplo, debido a la exposición a elevadas temperaturas. Por "elevada temperatura" se supone cualquier temperatura anteriormente la temperatura en donde la formulación de la invención comprende un polipéptido de CD-RAP normalmente se almacena. La
10 temperatura de almacenamiento normal está entre aproximadamente 4°C y 10°C, preferentemente entre aproximadamente 4°C y 8°C, más preferentemente entre aproximadamente 4°C y 6°C, incluso más preferentemente a una temperatura de aproximadamente 4°C. Las causas
15 adicionales para la formación de agregados pueden ser el pH de la formulación, la fuerza iónica de la formulación, la presencia de ciertos surfactantes (p.ej, polisorbato 20 y polisorbato 80), agentes emulsionantes y/o porque un polipéptido tiene una tendencia inherente de formar tales
20 agregados. Sin limitaciones teóricas, se supone que la formación agregada de polipéptidos de CD-RAP podría causarse por uno o más de las causas ya mencionadas y puede dar como resultado a una pérdida de la actividad.

En consecuencia, se preve que un polipéptido de CD-
25 RAP sea preferentemente estable en la medida que no forma sustancialmente agregados (por ejemplo, debido a uno o más de las causas ya mencionadas) durante el almacenamiento y/o durante o después del congelar descongelando. En consecuencia, se preve preferentemente que no más del 10%
30 de un polipéptido de CD-RAP, más preferentemente no más del 8%, incluso más preferentemente no más del 5%, incluso adicionalmente preferentemente no más del 3%,

particularmente preferentemente no más del 1% con relación a la cantidad del polipéptido de CD-RAP al principio de almacenamiento formen agregados.

En la alternativa, se preve que un polipéptido de CD-RAP sea preferentemente estable en la medida que no forma dímeros u oligómeros. Póngalo diferentemente, la estabilidad de una proteína CD-RAP puede determinarse según el porcentaje de proteína monomérica en la solución, con un porcentaje bajo del degradado (p.ej, fragmentado) y/o proteína con agregados. Por ejemplo, una formulación de la invención que comprende una proteína CD-RAP puede incluir al menos el 90%, más preferentemente al menos el 92%, incluso más preferentemente al menos el 95%, adicionalmente incluso más preferentemente al menos el 97%, particularmente preferentemente al menos el 98%, con mayor preferencia proteína CD-RAP monomérica del 99%.

Por "el agregado" se supone una interacción física entre moléculas protéicas que da como resultado la formación de dímeros covalentes o no covalentes u oligómeros (es decir entidades de elevado peso molecular) que puede permanecer soluble, o formar agregados insolubles que esto precipita de la solución. Un "agregado" también incluye la proteína CD-RAP degradada y/o fragmentada. El nivel de la agregación protéica en una formulación puede cuantificarse antes, en sustancialmente el mismo período de tiempo que, o después, la adición de un aminoácido cargado que se describe aquí a la formulación. En ciertas modalidades, el nivel de agregación se cuantifica al menos una vez entre aproximadamente 1 día y aproximadamente 12 semanas después de la adición de un aminoácido cargado como se describe aquí a la formulación. En otras modalidades, el nivel de

agregación se cuantifica al menos una vez entre aproximadamente 1 mes y 36 meses después de la adición de un aminoácido cargado como se describe aquí a la formulación.

5 Como mencionado con anterioridad en la presente, varios diferentes métodos analíticos poderse usar para detectar la presencia y los niveles de los agregados en una formulación que comprende una proteína. Éstos incluyen, entre otras cosas, por ejemplo, electroforesis
10 sobre gel de poliacrilamida de origen natural (PAGE), dodecil sulfato sódico - electroforesis sobre gel de poliacrilamida (SDS-PAGE), electroforésis en gel capilar (CGE), cromatografía de exclusión de tamaños (SEC), ultracentrifugación analítica (ABC (área bajo la curva)),
15 fraccionamiento del flujo de campo (FFF), detección de la dispersión de luz, velocidad de la sedimentación, espectroscopia de la luz ultravioleta, diferencial que explora calorimetry, turbidimetría, nefelometría, microscopia, cromatografía líquida de alta resolución de
20 exclusión molecular (HPLC de SEC), cromatografía en fase líquida de alta eficacia de fase inversa (RP-HPLC), espectrometría de masas de tándem de la ionización por electroaspersión (ESI-MS) y tándem RP-HPLC/ESI-MS, fluyen
25 fluyen campo el método del fraccionamiento y estático y/o dispersión dinámica de luz. Estos métodos se pueden usar por sí solo o combinados. Preferentemente, los métodos analíticos de detectar la presencia y los niveles de los agregados en una formulación que comprende una proteína, preferentemente CD-RAP, son la cromatografía líquida de
30 alta resolución de exclusión molecular (HPLC de SEC) y fluyen fluyen campo el método del fraccionamiento estático y/o dispersión dinámica de luz.

Un problema común con una formulación que comprende una proteína es la acumulación irreversible de agregados con el período de tiempo, térmico, o esfuerzo cortante. Por lo común, cuando los agregados precipitan éstos forman las partículas espaciosas que son fáciles a detectar. Los agregados solubles más pequeños, no covalentes, sin embargo, que a menudo son precursores a la precipitación de las partículas espaciosas, son más difíciles de detectar y cuantificar. Así, los métodos de detectar y cuantificar la agregación protéica en una formulación proteínica tienen que basarse en la clase de agregado que se evalúa.

Entre los mayores que métodos, los métodos sugeridos de determinar la presencia y/o las cantidades de los agregados solubles, covalentes en una formulación proteínica son: SEC/dispersión de luz, SDS-PAGE, CGE, RP-HPLC/ESI-MS, FFF y ABC (área bajo la curva): Los métodos sugeridos de determinar la presencia y/o las cantidades de los agregados solubles, no covalentes en una formulación proteínica son: SEC, PAGE, SDS-PAGE, CGE, FFF, ABC (área bajo la curva) y dispersión dinámica de luz. Los métodos sugeridos de determinar la presencia y/o las cantidades de los agregados insolubles, no covalentes en una formulación proteínica son: espectroscopia de la luz ultravioleta, turbidimetría, nefelometría, microscopia, ABC (área bajo la curva) y dispersión dinámica de luz.

Considerando el mayor que, es otra modalidad de la invención el proporcionar un método para pruebas de estabilidad aceleradas de la estabilidad un polipéptido de CD-RAP en una formulación de la invención que comprende las etapas de analizar la actividad del polipéptido formulado según la invención antes del almacenamiento, es

decir, cero del período de tiempo, almacenando la composición en aproximadamente entre 37°C y 42°C, preferentemente en aproximadamente 37°C durante al menos un mes y midiendo la estabilidad del polipéptido, y

5 comparando la estabilidad del cero del período de tiempo a un punto temporal del mes. Esta información es provechosa para temprano la eliminación de por lotes o lotes que parecen tener la estabilidad adecuada inicialmente, aún no almacene el pocillo durante períodos más largos.

10 Más aún, la formulación de la invención preferentemente proporciona el almacenamiento a largo plazo mejorado tal que la proteína CD-RAP es estable sobre el curso de almacenamiento en líquido o en estados congelados, preferentemente en la forma líquida. Como se

15 utiliza aquí, la frase se entiende que el almacenamiento "a largo plazo" significa que la formulación puede almacenarse durante al menos un mes, dos o tres meses o más, durante seis meses o más, y preferentemente durante un año o más. El almacenamiento a largo plazo también es

20 entendido significar que la composición farmacéutica se almacena como un líquido en 2-8 C o se congela, p.ej, en- 20°C o más frío, así la formulación no pierde preferentemente su actividad biológica al grado como se describe aquí y/o no forma agregados al grado como se

25 describe aquí y/o comprende monómeros al grado como se describe aquí. Las pruebas de estas propiedades se describen aquí en otra parte. También es contemplado y demostrado en los Ejemplos que la formulación puede congelarse y se descongeló más que una vez.

30 En un aspecto de la invención, la proteína CD-RAP en las formulaciones es estable en una forma líquida durante al menos 1 mes, de 2 meses, 3 meses; al menos 4 meses, al

menos 5 meses; al menos 6 meses; al menos 12 meses. El producto intermedio de intervalos a los mayores que periodos de tiempo mencionados también es conceptualizado para ser la parte de esta invención, p.ej, 9 meses, etcétera. Además, los intervalos de valores al usar una combinación de cualquiera de lo anterior mencionaron valores ya que los límites inferiores y/o superiores pretenden incluirse. Preferentemente, la formulación es estable a temperatura ambiente (sobre 20°C) o en 30°C durante al menos 1 mes y/o cuadra en aproximadamente 2-8°C para al menos 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11 o 12 meses, o más preferentemente estabilice en aproximadamente 2-8°C durante al menos 2 años. Más aún, la formulación está la congelación preferentemente estable que sigue (a, p.ej, -80°C) y el deshielo de la formulación, aquí también referida a ya que un "se congelan/descongelan el ciclo."

De improviso, el apuntamiento de inventores de la presente a la estabilización de una proteína CD-RAP en elevada concentración, tenga descubrió que un aminoácido que tiene una carga neta en un pH entre aproximadamente 6 y 8 permite la preparación de formulaciones de CD-RAP muy concentradas y actúa para reducir la agregación de polipéptidos de CD-RAP en tal formulación durante periodos largos, permitiendo así una formulación estable como se describe aquí.

En consecuencia, en un aspecto preferido, el aminoácido cargado comprendido por la formulación estable de la invención tiene una carga neta en un pH entre aproximadamente 6 y 8.

El término "carga neta" se supone que las cargas positivas y negativas en la superficie del aminoácido o proteína que dependen de la naturaleza del aminoácido o

los aminoácidos de la proteína no son el cero. La carga neta depende de la cantidad y las identidades de los aminoácidos cargados, y en el pH así como en la posición del aminoácido dentro de la secuencia primaria de un polipéptido. En un pH específico las cargas positivas y negativas se equilibrarán y la carga neta será el cero. Este pH se llama el punto isoeléctrico donde la proteína tiene su solubilidad más baja.

Más preferentemente, el aminoácido o el aminoácido cargado se seleccionan a partir del grupo que comprende glicina, arginina, lisina, histidina, ácido aspártico, ácido glutámico y sala de lo mismo. Histidina, glutamato, arginina o una sal de lo mismo particularmente se prefieren. En algunas modalidades, las combinaciones de los aminoácidos ya mencionados o sales de lo mismo se aplican en la formulación de la invención.

En otras modalidades, el aminoácido es un análogo de arginina, lisina o histidina que mantiene la capacidad de potenciar la solubilidad de CD-RAP preferentemente a pH 6.0 o mayor. Tales análogos incluyen, entre otras cosas, dipéptidos y tripéptidos que contienen arginina, lisina o histidina.

En modalidades adicionalmente preferidas la sal aminoacídica es cloruro de arginina (preferentemente en una solución entre el pH 6.0 a 8,0, más preferentemente entre el pH 6.5 y 7.5, con mayor preferencia a pH 6.0 o 7.4), fosfato de arginina (preferentemente en una solución entre el pH 6.0 a 8,0, más preferentemente entre el pH 6.5 y 7.5, con mayor preferencia a pH 6.0 o 7.4), fosfato de histidina (preferentemente en una solución entre el pH 6.0 a 8,0, más preferentemente entre el pH 6.5 y 7.5, con mayor preferencia a pH 6.0 o 7.4), cloruro de histidina

(preferentemente en una solución entre el pH 6.0 a 8,0, más preferentemente entre el pH 6.5 y 7.5, con mayor preferencia a pH 6.0 o 7.4), potasio y glutamato de sodio (preferentemente en una solución entre el pH 6.0 a 8,0, más preferentemente entre el pH 6.5 y 7.5, con mayor preferencia a pH 6.0 o pH7.4). Los aminoácidos y las sales de lo mismo aplicado en la invención son conocidos en la técnica y son elaborados por métodos conocidos y disponibles de proveedores comerciales.

La concentración del aminoácido cargado, sale de lo mismo o cualquier aminoácido especificado como glicina, arginina, lisina, histidina, ácido aspártico, el ácido glutámico y las sales de lo mismo en la formulación están preferentemente entre aproximadamente el 0,5% (p/v) hasta aproximadamente el 8% (p/v), el 1% (p/v) hasta aproximadamente el 8% (p/v), el 1% (p/v) hasta aproximadamente el 5% (p/v), el 1,5% (p/v) hasta aproximadamente el 5% (p/v), 2. % (p/v) hasta aproximadamente el 5% (p/v), el 0,5% (p/v) hasta aproximadamente el 3% (p/v), más preferentemente aproximadamente el 1,0% (p/v) hasta aproximadamente el 3% (p/v), incluso más preferentemente aproximadamente el 1,5% (p/v) hasta aproximadamente el 3% (p/v), incluso adicionalmente preferentemente el 2,0% (p/v) hasta aproximadamente el 3% (p/v), y particularmente preferentemente en aproximadamente el 2,5% (p/v). Los aminoácidos cargados están disponibles de proveedores comerciales.

La formulación de la invención se prepara combinando, además de un polipéptido de CD-RAP como se describe aquí, un aminoácido que tiene una carga neta en un pH entre aproximadamente 6 y 8 p.ej en una solución acuosa.

Adicionalmente, un amortiguador, un modificador de la tonicidad y/o un estabilizador y, opcionalmente, un excipiente adicional puede agregarse según sea necesario. Las personas que tienen la habilidad común en la técnica
5 entenderá que la combinación de diversos componentes para incluirse en la formulación puede llevarse a cabo en cualquier orden adecuado. Por ejemplo, el amortiguador puede agregarse primero, medio o durar y el modificador de la tonicidad también puede agregarse primero, medio o
10 último. También es para ser entendido por el experto común en la técnica que algunos de estos productos químicos pueden ser incompatibles en ciertas combinaciones, y en consecuencia, son fácilmente sustituidos con diferentes productos químicos que tienen propiedades similares, pero
15 son compatibles en la mezcla relevante.

En una modalidad preferida de la invención el aminoácido comprendió en la formulación de la invención y cualquiera de los ingredientes adicionales como un amortiguador, modificador de la tonicidad, estabilizador,
20 el excipiente que puede comprenderse en la formulación se selecciona tal que proporciona estabilidad a la proteína CD-RAP sobre el repetido se congelan/descongelan ciclos (preferentemente más de 5 se congelan/descongelan ciclos (5°C a-25°C, refrigeración y tasa de calentamiento
25 1.0°C/min con una etapa isotérmica de 15 minutos entre cada ciclo).

En un aspecto preferido de la invención la formulación comprende un amortiguador.

El término "amortiguador" como se utiliza aquí,
30 incluye a aquellos agentes que mantienen el pH en un intervalo deseado. El amortiguador es una solución acuosa que comprende una mezcla de un ácido débil y su base

conjugada o una base débil y su ácido conjugado. Tiene la propiedad que el pH de la solución cambia muy poco cuando se agrega una pequeña cantidad de un ácido concentrado o base. Las soluciones amortiguadoras se usan como unos
5 medios del pH que mantiene en un valor casi constante en una amplia variedad de solicitudes químicas. Las soluciones amortiguadoras se utilizan mantienen un cierto nivel en la escala del pH. En términos generales, un amortiguador cuando aplicado en la formulación de la
10 invención preferentemente estabiliza una proteína CD-RAP.

"Los amortiguadores aminoacídicos" cuando usado aquí incluyen, por ejemplo, la base aminoacídica p.ej arginina y su sal conjugada. Los ejemplos de amortiguadores aminoacídicos son cloruro de arginina/arginina, cloruro de
15 histidina/histidina de fosfato de arginina/arginina, fosfato de histidina/histidina / ácido glutámico / glutamato de potasio o sodio. Estos ejemplos preferentemente se aplican en la invención.

El pH preferido de una formulación como se describe
20 aquí puede seleccionarse de los intervalos que siguen: de aproximadamente 4 hasta aproximadamente 10, de aproximadamente 5 hasta aproximadamente 9, preferentemente, de aproximadamente 6 hasta aproximadamente 8. En consecuencia, un amortiguador que
25 puede mantener una solución a pH 6.0 a 8,0 se utiliza preferiblemente. El término "sobre" cuando usado en el contexto del valor/intervalo del pH preferentemente significa que un valor numérico que tiene un intervalo de +/-el 25% alrededor del valor citado. Cuando el pH de la
30 composición farmacéutica se configura en o cerca de niveles fisiológicos, comodidad del paciente mediante la administración se maximiza.

En términos generales, la naturaleza de un amortiguador y/o el aminoácido y su concentración es tal que la osmolalidad de la formulación está entre 280 - 320 mosmol/kg. En términos particulares, se prefiere esto el
5 pH incluirse dentro de un intervalo del pH aproximadamente 5,8 a 8,4, con aproximadamente 6,2 a 7,4 preferirse, más preferentemente el pH está entre el pH 5.8 a 8,4, con mayor preferencia entre 6,2 a 7,4, sin embargo, hay que entender que el pH puede ajustarse si es necesario para
10 maximizar la estabilidad y la solubilidad del polipéptido en una formulación particular y como tal, un pH fuera de intervalos fisiológicos, aún preferentemente tolerables al paciente, se incluye dentro del alcance de la invención.

Los ejemplos no limitantes de amortiguadores que se
15 pueden usar en una formulación descrita aquí incluyen, histidina, succinato, gluconato, citrato, tris (trometamol), Bis-Tris, MOPS, ACES, TES, HEPES, EPPS, etilendiamina, ácido fosfórico, ácido maléico / fosfato, citrato, ácido 2-morpholinoethanesulfonic (MES), fosfato
20 de sodio, acetato de sodio y dietanolamina.

Los amortiguadores preferidos son amortiguadores de fosfato, amortiguadores de Tris, amortiguadores aminoacídicos tal como entre otros arginina, histidina y amortiguador de glutamato. Más preferentemente, los
25 amortiguadores que siguen se aplican en la formulación de la invención: fosfato de arginina (preferentemente entre pH 6.0 a 8,0, más preferentemente entre pH 6.5 y 7.5, con mayor preferencia a pH 6.0 o 7.4), fosfato de histidina (preferentemente entre pH 6.0 a 8,0, más preferentemente
30 entre pH 6.5 y 7.5, con mayor preferencia a pH 6.0 o 7.4), cloruro de histidina (preferentemente entre pH 6.0 a 8,0, más preferentemente entre pH 6.5 y 7.5, con mayor

preferencia a pH 6.0 o 7.4). Los amortiguadores aplicados en la invención son conocidos en la técnica y son elaborados por métodos conocidos y disponibles de proveedores comerciales.

5

La concentración de un aminoácido, sal de lo mismo, glicina, arginina, lisina, histidina, ácido aspártico, ácido glutámico y sales de lo mismo, un amortiguador, tal como entre otros amortiguador de Tris, amortiguador de
 10 histidina, amortiguador de fosfato de arginina y amortiguador de fosfato en las composiciones de la invención puede seleccionarse de los intervalos que siguen: de aproximadamente 1 hasta aproximadamente 500 mM, de aproximadamente 1 hasta aproximadamente 450 mM, de
 15 aproximadamente 1 hasta aproximadamente 400 mM, de aproximadamente 1 hasta aproximadamente 350 mM, de aproximadamente 1 hasta aproximadamente 300 mM, de aproximadamente 1 hasta aproximadamente 250 mM, de aproximadamente 1 hasta aproximadamente 200 mM, de
 20 aproximadamente 1 hasta aproximadamente 150 mM, de aproximadamente 1 hasta aproximadamente 100 mM, de aproximadamente 1 hasta aproximadamente 50 mM, de aproximadamente 1 hasta aproximadamente 40 mM, de aproximadamente 1 hasta aproximadamente 30 mM, de
 25 aproximadamente 1 hasta aproximadamente 20 mM, de aproximadamente 1 hasta aproximadamente 10 mM, de aproximadamente 10 hasta aproximadamente 500 mM, 10 hasta aproximadamente 450 mM, 10 hasta aproximadamente 400 mM, 10 hasta aproximadamente 350 mM, 10 hasta aproximadamente
 30 300 mM, 10 hasta aproximadamente 250 mM, 10 hasta aproximadamente 200 mM, 10 hasta aproximadamente 150 mM, de aproximadamente 30 hasta aproximadamente 500 mM, 30

hasta aproximadamente 450 mM, 30 hasta aproximadamente 400 mM, 30 hasta aproximadamente 350 mM, 30 hasta aproximadamente 300 mM, 30 hasta aproximadamente 250 mM, 30 hasta aproximadamente 200 mM, o 30 hasta 5 aproximadamente 150 mm.

Ya que un amortiguador de Tris la concentración más preferida es 30 a 100 mM, ya que histidina almacena la concentración preferida en un buffer es 45 a 60 mM de o 250 a 350 mM, con mayor preferencia 50 mM de a 300 mM, ya 10 que un amortiguador de fosfato la concentración preferida es 45 a 60 mM, ya que arginina almacena la concentración preferida en un buffer es 250 a 380 mM de y para un amortiguador de glutamato la concentración preferida es 250 a 360 mM, con mayor preferencia 280 a 360 mm.

15 En un aspecto preferido de la invención, la formulación comprende un modificador de la tonicidad. Como se utiliza aquí, el término "modificador de la tonicidad" pretende significar un compuesto o compuestos que poderse usar para ajustar la tonicidad de una formulación líquida.

20 Los modificadores de la tonicidad adecuados incluyen glicerina, lactosa, manitol, dextrosa, cloruro de sodio, sulfato de magnesio, cloruro de magnesio, cloruro de potasio, sulfato de sodio, sorbitol, trehalosa, sacarosa, raffinose, maltosa y otros conocidos a aquellos o

25 habilidad común en la técnica. En una modalidad, la tonicidad de la formulación líquida se acerca la de la tonicidad de sangre o plasma. Un modificador de la tonicidad contribuye a la osmolalidad de la composición. La osmolalidad del suero humano es de aproximadamente 250-

30 350mOsm/kg. Donde manténgase la estabilidad protéica y minimice la incomodidad del paciente, es generalmente preferible que la formulación sea isotónica, es decir, que

tenga la osmolalidad aproximadamente igual, con el líquido sérico o sinovial humano. En consecuencia, la osmolalidad de la composición es preferentemente de 180 a 420mOsm/kg, más preferentemente de 280 a 320mOsm/kg. Dentro de este
5 intervalo es la osmolalidad más deseada, es decir, isotonicidad. El término "isotónico" significa que la formulación de interés tiene esencialmente la misma presión osmótica que la sangre humana. Las formulaciones isotónicas tendrán generalmente una presión osmótica de
10 aproximadamente 270-328 mOsm. La presión osmótica ligeramente hipotónica es 250-269 y la presión osmótica ligeramente hipertónica es 328-350 mOsm. La presión osmótica puede cuantificarse, por ejemplo, al usar una presión de vapor o congelación de hielo teclean osmometer.

15 Sin embargo, el experto en la técnica entenderá que la osmolalidad de la composición puede ser más elevada o disminuir ya que las condiciones específicas requieren. Una variedad de modificadores de la tonicidad se conoce en la técnica (ver, p.ej, el párrafo de la Solicitud de
20 Patente Estadounidense 2003/0180287). Otros componentes de la formulación, incluyendo, entre otros, sales (p.ej, cloruro de sodio, cloruro de potasio y citrato de sodio), amortiguadores, disacáridos (p.ej, sacarosa, glucosa y manitol), agentes volumétricos y surfactantes, también
25 pueden contribuir a la osmolalidad de la composición. La concentración del modificador de la tonicidad en la formulación está preferentemente entre aproximadamente 1 mM de a 1000 mM, más preferentemente aproximadamente 10 mM de hasta aproximadamente 200 mM. Un modificador de la
30 tonicidad preferido aplicado en la formulación de la invención es cloruro de potasio o cloruro de sodio, preferentemente en una concentración menor que 150 mM,

menos que 100 mM, menos que 80 mM, menos que 50 mM, en una
concentración de 10 a 50 mM, 40 a 90 mM, 40 a 120 mM, 50 a
120 mM, 50 a 150 mM, 80 a 150 mM, 80 a 120 mM, 40 a 45 mM,
80 a 90 mM, 100 a 150 mM, 100 a 120 mM, 42.5 mM, 89.5 mM,
5 116.5 mM de o 150 mm.

En algunas modalidades, la formulación comprende
además el cloruro de sodio (NaCl). Particularmente
modalidades, la formulación comprende 1-200mM, o menos que
50 mM, menos que 40 mM, menos que 35 mM, menos que 30 mM,
10 menos que 25 mM, menos que 20 mM, menos que 15 mM, menos
que 10 mM, o menos que 5 mM de NaCl. En ciertas
condiciones, NaCl puede causar una dificultad durante la
liofilización o dar como resultado al aspecto de
opalescencia en el liofilizado reconstituido. En
15 consecuencia, en una modalidad menos preferida, la
formulación no comprende NaCl.

Además de la proteína CD-RAP, una formulación como se
describe aquí también puede contener otras sustancias.
Estas sustancias incluyen, entre otras cosas, agentes
20 estabilizadores (estabilizadores).

En consecuencia, en un aspecto preferido, la
formulación comprende un estabilizador. El término "agente
estabilizador" se refiere a un agente que mejora u otra
cosa potencia la estabilidad de la formulación,
25 particularmente de la proteína CD-RAP. Un agente
estabilizador puede ser un disacárido, un alcohol
polihídrico, un quelante metálico o una combinación de
quelantes metálicos, un limpiador radical o combinaciones
de lo mismo.

30 Preferentemente, el disacárido cuando usado como el
agente estabilizador puede ser un no azúcar reductor,
p.ej, sacarosa, trehalosa o mannososa. En ciertas

modalidades, la concentración de disacárido en la composición se selecciona de los intervalos que siguen: de 0,5 al 5%, de 0,5 al 4%, de 0,5 al 3%, de 0,5 al 2,5%, de 0,5 al 2%, de 0,5 al 1,5%, de 0,5 al 1%, de 1 al 1,5%, de 1,5 al 2%, de 2 al 2,5%, de 2,5 al 3%, del 3 a 4%, del 4 a 5% o más del 5% (p/v). Particularmente modalidades, la concentración de disacárido en la composición es de aproximadamente 0.5 al 5%, por ejemplo aproximadamente 0,5 al 2,0% (p/v). Un estabilizador preferido aplicado en la formulación de la invención es la sacarosa, preferentemente en el 5,0% o el manitol, preferentemente en el 5,0% (p/v).

El agente estabilizador también puede ser un alcohol polihídrico como glicol, glicerol, erythritol, threitol, arabitol, xilitol, ribitol, manitol, sorbitol, dulcitol, iditol, isomalta, maltitol, lactitol o polyglycitol.

Otro estabilizador puede ser un quelante metálico o una combinación de quelantes metálicos. En modalidades específicas, los quelantes metálicos son DTPA, EGTA y DEF.

En algunas modalidades, la concentración de DTPA o EGTA en la formulación proteínica abarca desde sobre 1 μ M hasta aproximadamente 10 mM, de aproximadamente 1 μ M hasta aproximadamente 5 mM, de aproximadamente 10 μ M hasta aproximadamente 10 mM, 50 μ M hasta aproximadamente 5 mM, o de aproximadamente 75 μ M hasta aproximadamente 2.5 mM. En algunas modalidades, la concentración de DEF en la formulación proteínica abarca desde aproximadamente 1 μ M hasta aproximadamente 10 mM, de aproximadamente 1 μ M hasta aproximadamente 5 mM, de aproximadamente 10 μ M hasta aproximadamente 1 mM, o de aproximadamente 20 μ M hasta aproximadamente 250 μ M.

El estabilizador también puede ser un limpiador de

radicales libres, sobre todo un limpiador de radicales oxigénicos. En modalidades específicas, el limpiador de radicales libres es el manitol o histidina. En algunas modalidades, la concentración de manitol en la formulación proteínica abarca desde aproximadamente el 0,01% hasta aproximadamente el 5%, aproximadamente del 0,1% hasta aproximadamente el 5%, aproximadamente del 0,5% hasta aproximadamente el 5%, o aproximadamente del 1% hasta aproximadamente el 5%.

En otras modalidades, el agente que reduce la agregación de la proteína de la formulación es una combinación de un quelante metálico y un limpiador de radicales libres. En algunas modalidades, el agente que reduce la agregación de una proteína o proteínas en una formulación es el citrato. En ciertas modalidades, la concentración de citrato en la formulación proteínica abarca desde sobre 0.5mM de hasta aproximadamente 50 mM, de aproximadamente 0.5mM de hasta aproximadamente 25 mM, de aproximadamente 1 mM de hasta aproximadamente 35 mM, de aproximadamente 5 mM de hasta aproximadamente 25 mM, o de aproximadamente 5 mM de hasta aproximadamente 10 mm.

En una modalidad preferida, una formulación descrita aquí comprende un excipiente. Preferentemente el excipiente se selecciona a partir del grupo que comprende un crioprotector, un lioprotector, surfactante, un agente volumétrico, un antioxidante y combinaciones de lo mismo.

Los excipientes, también referidos aditivos como químicos, co-solutos o cosolventes, que preferentemente estabilizan el polipéptido de CD-RAP mientras en la solución (también en formas secadas o congeladas) también puede agregarse a una formulación de la invención. Preferentemente, los excipientes contribuyen a la

estabilidad de la proteína CD-RAP, pero hay que entender que los excipientes pueden contribuir otra cosa a las propiedades físicas, químicas, y biológicas de la formulación. Los excipientes son conocidos en la técnica y
 5 son elaborados por métodos conocidos y disponibles de proveedores comerciales.

Los ejemplos de excipientes incluyen entre otras cosas los azúcares/polioles como: sacarosa, lactosa, glicerol, xilitol, sorbitol, manitol, maltosa, inositol,
 10 trehalosa, glucosa; polímeros como: albúmina sérica (albúmina sérica de bovino (BSA), SA humano o HA recombinante), .dextrán, PVA, hidroxipropil metilcelulosa (HPMC), polietilenimina, gelatina, polivinilpirrolidona (PVP), hidroxietilcelulosa (HEC), hydroxyethylstarch
 15 (HES); solventes no acuosos como: alcoholes polihídricos, (e. g., PEG, etilenglicol y glicerol) dimethylsulfoxide (DMSO) y dimetilformamida (DMF); aminoácidos como: prolina, L-serina, ácido glutámico de sodio, alanina, glicina, clorhidrato de la lisina, sarcosine y ácido gama-aminobutírico; surfactantes como: Tween-80, Tween-20, SDS,
 20 polisorbato, copolímero del polioxietileno; y excipientes diversos como: fosfato de potasio, acetato de sodio, sulfato de amonio, sulfato de magnesio, sulfato de sodio, N-óxido de trimetilamina, betaína, iones metálicos (e. g.,
 25 zinc, cobre, calcio, manganeso y magnesio), CHAPS, monolaurato, 2-O-beta-mannoglycerate o cualquier combinación del mayor que. En ciertas modalidades, la concentración de surfactante en la formulación abarca desde 0.001 al 5,0%, de 0,001 al 2,5%, de 0,001 al 1%, de
 30 0,001 al 0,5%, de 0,001 al 0,2%, de 0,001 al 0,1%, de 0,001 al 0,05%, de 0,001 al 0,01%, o de 0,001 al 0,005% por peso.

"Los crioprotectores" incluyen sustancias que proporcionan la estabilidad a la proteína congelada durante producción, congelación, almacenamiento, manejo, distribución, reconstitución o uso. En un aspecto particular, "los crioprotectores" incluyen sustancias que protegen la proteína de tensiones inducidas por el proceso helado. Los crioprotectores pueden tener efectos del lioprotector. Los ejemplos no limitantes de crioprotectores incluyen los azúcares, como sacarosa, glucosa, trehalosa, manitol, mannososa y lactosa; polímeros, como dextrán, almidón del hidroxietilo y polietilenglicol; surfactantes, como polisorbatos (p.ej, PS-20 o PS-80); y aminoácidos, como glicina, arginina, leucina y serina. Un crioprotector que muestra la toxicidad baja en sistemas biológicos generalmente se usa. El crioprotector, de ser incluido en la formulación, se agrega a una concentración final de entre aproximadamente el 1% y aproximadamente el 10% (p/v), preferentemente a una concentración final de 0,5 al 8% (p/v), 0.5 al 6% (p/v), 0.5 al 8% (p/v), 0.5 al 5% (p/v), el 1 a 8% (p/v), el 1 a 6% (p/v), el 1 a 8% (p/v), el 1 a 5% (p/v), 1.5 al 8% (p/v), 1.5 al 6% (p/v), 1.5 al 8% (p/v), 1.5 al 5% (p/v), el 2 a 8% (p/v), el 2 a 6% (p/v), el 2 a 8% (p/v), 2 al 5,5% (p/v).

Un disacárido como se describe aquí puede actuar como un lioprotector o crioprotector. "Los lioprotectores" incluyen sustancias que previenen o reducen la inestabilidad química o física de una proteína mediante liofilización y almacenamiento subsecuente. En un aspecto, el lioprotector previene o reduce instabilities químico o físico en la proteína ya que agua se elimina de la composición durante el proceso de secado. En un aspecto adicional, el lioprotector se estabiliza la proteína por

la ayuda mantienen la conformación apropiada de la proteína a través de unión de hidrógeno.

En consecuencia, en un aspecto, un disacárido como se describe aquí puede servir para estabilizar la proteína CD-RAP durante la congelación. Como la protección durante la congelación puede depender mediante la concentración absoluta del disacárido (Carpintero et al., Pharm. Res. (1997), 14:969-975, las concentraciones mayores que el 5% pueden ser necesarias para maximizar la estabilidad.

En un aspecto, el disacárido estabiliza la proteína CD-RAP durante el secado. La protección durante el secado puede depender mediante la relación másica final entre la relación másica final entre el disacárido y la proteína. Carpintero et al., Investigación Farmacéutica 14:969-975 (1997). En consecuencia, en algunas modalidades, la concentración de disacárido se selecciona para lograr la relación másica deseada del disacárido a la proteína, por lo común al menos 1:1. En algunas modalidades, la estabilidad se optimiza en un disacárido: relación másica protéica de aproximadamente 5:1. En otras modalidades, la relación másica disaccharide:protein es 10:1, 20:1, 30:1, 40:1, 50:1, 100:1, 200:1, 300:1, 400:1, 500:1, 600:1, 700:1, 800:1, 900:1, 1000:1, o mayor que 1000:1.

En una modalidad, un lioprotector se agrega a una formulación descrita aquí. El término "lioprotector" como se utiliza aquí, incluye a agentes que proporcionan la estabilidad a la proteína durante la liofilización o proceso de la deshidratación (liofilizar primario y secundario - ciclos), al proporcionar una matriz vítrea amorfa y al unir con la proteína a través de la unión de hidrógeno, al sustituir las moléculas hídricas que se eliminan durante el proceso de secado. Esto ayuda a donde

mantenerse la conformación protéica, minimizar la degradación protéica durante el ciclo de la liofilización y mejorar la estabilidad del producto a largo plazo. El lioprotector se agrega a la formulación preliofilizada en un "lyoprotecting cantidad" que significa que, siguiente la liofilización de la proteína CD-RAP en la presencia de la cantidad lyoprotecting del lioprotector, la proteína esencialmente mantiene su estabilidad física y química e integridad mediante liofilización y almacenamiento.

Los ejemplos no limitantes de lioprotectores incluyen los azúcares, como sacarosa o trehalosa; un aminoácido, como glutamato de monosodio, glicina o histidina; una metilamina, como betaína; una sal liotrópica, como sulfato de magnesio; un poliol, como trihydric o alcoholes polihídricos más elevados, p.ej, arabitol, xilitol, sorbitol y manitol; polietilenglicol; pluronics; y combinaciones de lo mismo. La cantidad de lioprotector adicionado a una formulación es generalmente una cantidad que no da como resultado a una cantidad inaceptable de la degradación/agregación de la proteína cuando se liofiliza la formulación protéica. Donde el lioprotector es un azúcar (como sacarosa o trehalosa) y la proteína es un anticuerpo, los ejemplos no limitantes de concentraciones del lioprotector en la formulación protéica son de aproximadamente 10 mM de hasta aproximadamente 400 mM, y preferentemente de aproximadamente 30 mM de hasta aproximadamente 300 mM, y con mayor preferencia de aproximadamente 50 mM de hasta aproximadamente 100 mM. En ciertas modalidades, surfactante puede incluirse en la formulación.

Otro excipiente preferido es surfactante. El término "surfactantes" generalmente incluye a aquellos agentes que

protegen la proteína CD-RAP del aire/solución tensiones inducidas por la interconexión y tensiones inducidas de solución/superficie. Por ejemplo surfactantes pueden proteger la proteína de la agregación.

- 5 Los ejemplos de surfactantes incluyen, entre otras cosas, surfactantes no iónicos, como polisorbato (p.ej, polisorbato 80 o polisorbato 20); poloxámeros (p.ej, poloxámero 188); Tritón, dodecil sulfato sódico (SDS); sulfato del laurel de sodio; glucósido del octilo de sodio; sulfobetaina del laurilo, sulfobetaina del miristilo, linoleyl-sulfobetaina, sulfobetaina del estearilo, laurilo-sarcosine, miristilo-sarcosine, linoleyl-sarcosine, estearilo-sarcosine, linoleyl-betaína, miristilo - betaína, betaína del cetilo, lauroamidopropyl-
10 betaína, betaína de cocamidopropil, linoleamidopropyl-betaína, myristamidopropyl-betaína, palmidopropyl-betaína, isostearamidopropyl-betaína (p.ej, lauroamidopropyl), myristarnidopropyl-, palmidopropyl-, o isostearamidopropyl-dimetilamina; metilo de sodio cocoyl-u
20 ofeyle-aurato de metilo disódico; y la serie de Monaquat (Mona Industries, Inc., Paterson, Nueva Jersey) Glicol de polietilo, glicol del polipropilo y copolímeros de etileno y propilenglicol (p.ej, pluronics, PF68). La cantidad de surfactante adicionado es tal que mantiene la agregación
25 de la proteína reconstituida a un nivel aceptable como evaluado al usar, p.ej, HPLC de SEC para determinar el porcentaje de especies de elevado peso molecular (HMW) o especies de bajo peso molecular (LMW), y minimiza la formación de particulados después de la reconstitución de
30 un liofilizado de una formulación proteínica descrita aquí. Por ejemplo, surfactante puede encontrarse en una formulación (líquido, o antes de la reconstitución de un

liofilizado) en una cantidad de aproximadamente 0.001 hasta aproximadamente el 0,5%, p.ej, de aproximadamente 0.05 hasta aproximadamente el 0,3%. Surfactante preferido aplicado en la formulación de la invención es el
5 polisorbato 20 u 80.

Un mayo del excipiente preferido adicional por un agente volumétrico. A saber, en un aspecto de la invención, se contempla que la formulación de la invención se prepara en una formulación a granel y como tal, los
10 componentes de la composición farmacéutica se ajustan de modo que sea más elevado que se requeriría para la administración y se diluiría apropiadamente antes de la administración.

El término "agente volumétrico" como se utiliza aquí,
15 incluye a agentes que proporcionan la estructura del producto liofilizado sin interactuar directamente con el producto farmacéutico. Además del suministro de un concentrado farmacéuticamente elegante, los agentes volumétricos también pueden conferir calidades útiles en
20 cuanto a modificación de la temperatura de colapso, suministro de la protección del congelar-deshielo y potenciar la estabilidad protéica sobre el almacenamiento a largo plazo. Los ejemplos no limitantes de agentes volumétricos incluyen el manitol, glicina, la lactosa y la
25 sacarosa. Los agentes volumétricos pueden ser cristalinos (como glicina, manitol o cloruro de sodio) o amorfos (como el dextrán, almidón del hidroxietilo) y generalmente se usan en formulaciones proteínicas en una cantidad del 0,5% al 10%.

30 Preferentemente, el agente volumétrico aplicado en la formulación de la invención promueve la formación de un concentrado que es estéticamente aceptable, uniforme, o

mecánicamente concentrado. Los agentes volumétricos también preferentemente promueven la formación de una estructura del poro abierta y la facilidad y la velocidad de la reconstitución. Los agentes volumétricos también
 5 preferentemente reducen o previenen el colapso del concentrado, derretirse eutéctico o la retención de la humedad residual. En otro aspecto, los agentes volumétricos preferentemente ayudan a proteger la proteína CD-RAP contra tensiones (p.ej, tensiones físicas y
 10 químicas) y ayuda mantienen la actividad protéica.

En ciertas modalidades, la concentración de agente volumétrico en la composición se selecciona de los intervalos que siguen: del 1 a 10%, del 1 a 8%, del 1 a 5%, del 2 a 8%, del 2 a 6%, de 2,5 al 6%, de 0,5 al 1%, de
 15 1 al 1,5%, de 1,5 al 2%, de 2 al 2,5%, de 2,5 al 3%, de 3 al 3,5%, de 3,5 al 4%, de 4 al 4,5%, de 4,5 al 5%, más del 5%, de 0,5 al 5%, de 0,5 al 4%, de 0,5 al 3%, de 0,5 al 2,5%, de 0,5 al 2%, de 0,5 al 1,5%, o de 0,5 al 1%. En ciertas modalidades, la concentración de agente
 20 volumétrico en la composición es 0.5 al 5%, por ejemplo 0.5 al 3%, incluso más exactamente 1.8 al 2%.

Otro excipiente preferido puede ser un antioxidante. Como se utiliza aquí, un "antioxidante" es una molécula capaz de disminución o prevención de la oxidación de otras
 25 moléculas. La oxidación es una reacción química que transfiere electrones de una sustancia a un agente oxidante. Para usarlos en los métodos de la invención, los antioxidantes fisiológicamente aceptables son del interés. Tales antioxidantes incluyen, entre otras cosas, agentes
 30 reductores, ácido ascórbico (vitamina C), ácido lipoico, melatonina, ácido úrico, carotenos, retinoles, tocoferoles y tocotrienoles, p.ej α -tocoferol (vitamina E), ubiquinona

(coenzima Q), y lo similar.

En algunas modalidades, la formulación puede contener opcionalmente un conservante. Un "conservante" es un compuesto que puede agregarse a las formulaciones aquí
 5 para reducir la actividad bacteriana. La adición de un conservante puede facilitar, por ejemplo, la producción de un multiuso formulación (multidosis). Los ejemplos de conservantes potenciales incluyen cloruro de octadecildimetilbencilamonio, cloruro de hexametonio,
 10 cloruro del benzalconio (una mezcla de cloruros de alquibencildimetilamonio donde los grupos alquilo son compuestos de la larga cadena), y cloruro del bencetonio. Otros tipos de conservantes incluyen alcoholes aromáticos como fenol, butilo y alcohol bencílico, parabenos de
 15 alquilo como metilo o propil parabeno, catecol, resorcinol, ciclohexanol, de 3 pentanoles, y m cresol. El conservante más preferido aquí es el alcohol bencílico.

Los Ejemplos anexados (ver Ejemplos 3 y 4) se manifiestan (también ver la Figura 6, 7, 10 y 11) que los
 20 ciclos de congelación-descongelación en las formulaciones analizadas (excepto el CD-RAP en 50 mM de fosfato de potasio/5 Sacarosa de % y 150 mM del pH de glicina 6.0) no tienen ningún efecto en la estabilidad protéica. En el último caso una disminución significativa en la
 25 concentración de CD-RAP después del tercer se congela/descongela el ciclo puede observarse. Sin embargo, en todas otras formulaciones la solución es traslúcida después de cada ciclo helado. Combinado con los resultados a partir de la cuantificación de RhCD-RAP por UV/Vis esto
 30 soluciona el problema de la presente invención y resultados en condiciones adecuadas para el RHCD-RAP en elevadas concentraciones.

En consecuencia, en modalidades más preferidas una formulación de la invención es un líquido, preferentemente acuoso, formulación que comprende al menos 5, 10, 15, 20, 25 o 30mg/mL de CD-RAP y un amortiguador seleccionado del grupo que comprende el potasio o el fosfato de sodio, TRIS, histidina, arginina y el amortiguador de glutamato y un aminoácido seleccionado del grupo que comprende aspartato, glutamato (preferentemente fosfato de glutamato), arginina (preferentemente fosfato de arginina o cloruro de arginina), histidina (preferentemente cloruro de histidina o fosfato de histidina), lisina y glicina.

Glutamato, aspartato, arginina, histidina, la lisina y glicina preferentemente se encuentran en la formulación en una cantidad del 2,5% (p/v). Preferentemente, el amortiguador y el aminoácido se seleccionan de modo que éstos proporcionen la estabilidad a la proteína CD-RAP más de 5 se congelan/descongelan ciclos (5°C a-25°C, refrigeración y tasa de calentamiento 1.0°C/min con una etapa isotérmica de 15 minutos entre cada ciclo).

En consecuencia, modalidades particularmente preferidas una formulación de la invención es un líquido, preferentemente acuoso, formulación que comprende al menos 30mg/mL de CD-RAP y 50 mM de cloruro TRIS y el 2,5% de glutamato; 50 mM de histidina y el 2,5% (p/v) de glicina, el 2,5% (p/v), glutamato (p/v) o el 2,5% (p/v) de lisina; 300 mM de pH de cloruro de histidina 6.0; 50, 100, 200 o 300 mM de pH de fosfato de histidina 6.0; 350 mM de pH de cloruro de arginina 6.0; 350 mM de pH de fosfato de arginina 6.0; 350 mM de pH de fosfato de arginina 7.4; o 300 mM de pH de glutamato de potasio 6.0. Estas formulaciones pueden comprender opcionalmente un estabilizador, modificador de la tonicidad y/o excipiente

como se describe aquí.

Hay que entender que los ciertos componentes de la composición pueden intercambiarse con alternativas conocidas en la técnica. Sin embargo, un experto en la
5 técnica también entenderá que la inclusión de ciertos componentes impedirá el uso de otros componentes, concentraciones o métodos para preparar la formulación, por motivos que incluyen, entre otras cosas, la compatibilidad química, el pH, la tonicidad y la
10 estabilidad.

Como mencionada aquí, esta solicitud generalmente se relaciona con el descubrimiento que la adición de un aminoácido cargado a una formulación puede reducir la agregación de la proteína CD-RAP en elevadas
15 concentraciones en una formulación. Sin tener en cuenta lo que hace que una proteína CD-RAP en elevada concentración en una formulación agregue, la adición de un aminoácido cargado o una combinación de los aminoácidos cargados como se describe aquí reducen la agregación de la proteína CD-
20 RAP en la formulación. En ciertas modalidades, la adición de un aminoácido cargado reduce la agregación en una formulación causada, por ejemplo, por almacenamiento, exposición a elevadas temperaturas, exposición a la luz, exposición al esfuerzo cortante, la presencia de
25 surfactantes, pH y condiciones iónicas y cualquier combinación de lo mismo.

Esta medida descubrió por los inventores de la presente se pueden usar para disminuir la agregación de proteínas de CD-RAP formuladas, particularmente en la
30 forma líquida. La agregación reducida así preferentemente se observa en una formulación líquida. Se supone que una agregación reducida también puede observarse cuando

almacenado directamente en la forma líquida para el uso posterior, almacenado en un estado congelado y se descongeló antes del uso, o preparó en una forma secada, tal como un liofilizado, secado al aire, o se secó por
5 aspersión la forma, para la reconstitución posterior en una forma líquida u otra forma antes del uso.

Así, se preve que una formulación descrita aquí pueda almacenarse por cualquier método conocido al experto en la técnica. Los ejemplos no limitantes incluyen la
10 congelación, de liofilización, y secado por pulverización la formulación.

En algunos casos, las formulaciones proteínicas se congelan para el almacenamiento. En consecuencia, se desea esto la formulación ser relativamente estable en tales
15 condiciones, incluyendo bajo ciclos del congelar-deshielo. Un método para determinar la conveniencia de una formulación debe someter una formulación de la muestra con al menos dos, p.ej, tres a diez ciclos de congelación y deshielo (por ejemplo por deshielo rápido a temperatura
20 ambiente o deshielo lento en hielo), determinación de la cantidad de especies de bajo peso molecular (LMW) y/o especies de elevado peso molecular (HMW) que se acumulan después de los ciclos del congelar-deshielo y comparación de ella a la cantidad de especies LMW o especies HMW
25 presenta en la muestra antes del procedimiento del congelar-deshielo. Un aumento de las especies LMW o HMW indica la estabilidad disminuida de una proteína almacenada como parte de la formulación. Cromatografía líquida de alta eficiencia de exclusión del tamaño (HPLC de SEC) poderse usar para determinar la presencia de
30 especies LMW y HMW.

En algunos casos, las formulaciones proteínicas

pueden almacenarse como un líquido. En consecuencia, como se describe aquí, se desea esto la formulación líquida ser estable en tales condiciones, incluyendo a diversas temperaturas. Por ejemplo, un método para determinar la
5 conveniencia de una formulación debe almacenar la formulación de la muestra a varias temperaturas (tal como 2-8, 15, 20, 25, 30, 35, 40, y 50°C) y monitorización de la cantidad de especies HMW y/o LMW que se acumulan con el tiempo. Más pequeño las cantidades de especies HMW y/o LMW
10 que se acumulan con el tiempo, mejor la condición de almacenamiento para la formulación. Además, el perfil de la carga de la proteína puede ser monitorizado por la cromatografía líquida de alta eficiencia por intercambio catiónico (CEX-HPLC). Alternativamente, las formulaciones
15 pueden almacenarse después de la liofilización.

El término "liofilizado" o "liofilizado" incluye un estado de una sustancia que se ha sometido a un procedimiento del secado como la liofilización, donde al menos el 90% preferentemente el 95%, con mayor preferencia
20 se ha eliminado el 98% de la humedad. En consecuencia, el término "liofilización" como se utiliza aquí, se refiere a un proceso por el cual el material secarse se congela primero seguido de la eliminación de hielo o solvente congelado por la sublimación en un ambiente al vacío. Un
25 excipiente (p.ej, lioprotector) puede incluirse en formulaciones que deben liofilizarse para potenciar la estabilidad del producto liofilizado mediante almacenamiento. El término "reconstituida de la formulación" como se utiliza aquí, se refiere a una
30 formulación que se ha preparado al disolver una formulación proteínica liofilizada en un diluyente tal que la proteína se dispersa en el diluyente. El término

"diluyente" como se utiliza aquí, es una sustancia que es farmacéuticamente aceptable (seguro y no tóxico para la administración a un humano) y es útil para la preparación de una formulación líquida, como una formulación reconstituida después de la liofilización. Los ejemplos no limitantes de diluyentes incluyen agua estéril, agua bacteriostático para inyección (BWFI), una solución amortiguada del pH (p.ej, solución salina amortiguada con fosfato-), solución salina estéril, solución de Ringer, solución dextrosa o soluciones acuosas de las sales y/o amortiguadores.

Al analizar una formulación de la estabilidad del componente protéico de la formulación después de que la liofilización es útil para determinar la conveniencia de una formulación. El método es similar a esto descrito anteriormente para la congelación, salvo que la formulación de la muestra se liofiliza, en vez de congelado, reconstituido al usar un diluyente, y la formulación reconstituida se analiza para la presencia de especies LMW y/o especies HMW. Un aumento de especies LMW o HMW en la muestra liofilizada comparado con una formulación de la muestra correspondiente que no es liofilizada indica la estabilidad disminuida en la muestra liofilizada.

En algunos casos, una formulación se seca por aspersión y luego se almacena. Para secarse por aspersión, una formulación líquida se atomiza por aerosoles en la presencia de un flujo de gas deshidratado. Agua se elimina de las gotículas de la formulación en el flujo de gas, las partículas dando como resultado secadas de la formulación del fármaco. Los excipientes pueden incluirse en la formulación a (i) protegen la proteína durante la

deshidratación que se seca por aspersión, (ii) protegen la proteína durante el almacenamiento después del secado por pulverización - y/o iii) proporcionan las propiedades de solución adecuadas para la aplicación en aerosol. El
5 método es similar a esto descrito anteriormente para la congelación, salvo que la formulación de la muestra se seca por aspersión en vez de congelado, reconstituido en un diluyente, y la formulación reconstituida se analiza para la presencia de especies LMW y/o especies HMW. Un
10 aumento de especies LMW o HMW en la muestra secada por aspersión comparado con una formulación de la muestra correspondiente que no es liofilizada indica la estabilidad disminuida en el aerosol - muestra secada.

Las formulaciones liofilizadas son por lo común
15 reconstituidas para el uso por la adición de una solución acuosa para disolver la formulación liofilizada. Una amplia variedad de soluciones acuosas poderse usar para reconstituir una formulación liofilizada. Preferentemente, las formulaciones liofilizadas son reconstituidas al usar
20 el agua. Las formulaciones liofilizadas son preferentemente reconstituidas con una solución que comprende esencialmente en agua (p.ej, USP WFI, o agua para inyección (WFI)) o agua bacteriostático (p.ej, USP WFI con el alcohol bencílico del 0,9%). Sin embargo, las
25 soluciones que comprenden amortiguadores y/o excipientes y/o uno o más farmacéuticamente aceptable transportan también puede usarse.

Las formulaciones liofilizadas o liofilizadas por lo común se preparan de líquidos es decir de soluciones,
30 suspensiones, emulsiones, y lo similar. Así, el líquido que debe experimentar a la liofilización o la liofilización preferentemente comprende todos los

componentes deseados en una formulación líquida reconstituida final. Como resultado, cuando reconstituido, la formulación liofilizada o liofilizada hará una formulación líquida deseada mediante reconstitución.

- 5 En otro aspecto de la invención, la formulación se preve para usarlo en la terapia. En consecuencia, la invención preve una composición farmacéutica (o medicamento) que comprende la formulación descrita aquí.

- 10 En aún otra modalidad, la invención proporciona un método para tratar un paciente que comprende la administración de una cantidad terapéuticamente efectiva de la formulación descrita aquí, donde el paciente tiene una enfermedad o trastorno que puede ser beneficiosamente sometida a tratamiento con un polipéptido de CD-RAP.

- 15 Preferentemente, la formulación descrita aquí se aplica en la profilaxis y/o tratamiento de una enfermedad que puede evitarse y/o sometido a tratamiento con el CD-RAP.

- 20 El término "paciente" pretende incluyen organismos vivos. Los ejemplos de pacientes incluyen mamíferos, p.ej, humanos, perros, vacas, caballos, diablos (raspatubo), ovejas, cabras, gatos, ratones, conejos, ratas y animales no humanos transgénicos. En modalidades preferidas de la invención, el paciente es un humano.

- 25 El término "efectiva de la dosis" o "dosis efectiva" se define como una cantidad suficiente para lograr o lograr al menos parcialmente el efecto deseado. El término "terapéuticamente efectiva de la dosis" se define como una cantidad suficiente para curar o detener al menos
30 parcialmente la enfermedad y sus complicaciones en un paciente que ya padece de la enfermedad. Las cantidades efectivas para este uso dependerán mediante la severidad

de la infección y el estado general del propio sistema inmunitario del paciente. El término "paciente" incluye al humano y otros pacientes de mamífero que reciben el uno o el otro tratamiento profiláctico o terapéutico.

5 La dosis adecuada o cantidad terapéuticamente efectiva, de la formulación dependerá de la condición de someterse a tratamiento, la severidad de la condición, terapia previa, e historial clínico del paciente y respuesta al agente terapéutico. La dosis apropiada puede
10 ajustarse según el juicio del médico que atiende tal que puede administrarse a la una vez del paciente o sobre una serie de administraciones. La composición farmacéutica puede administrarse como una suela terapéutica o combinada con terapias adicionales según sea necesarias.

15 Las composiciones farmacéuticas de esta invención son particularmente útiles para la administración parenteral, es decir, subcutáneamente, intramuscularmente, intravenosamente, intraarticulares y/o intrasinoviales. La administración parenteral puede ser por inyección en bolo
20 o infusión continua.

 En una modalidad preferida, la inyección es una inyección local o no sistémica, preferentemente en sinovias, sinovias líquido espacial, sinovial, o área conjunta, subcondral sinovial, defecto osteocondral,
25 espacio intraarticular preferentemente de la rodilla, borde saliente, cadera, pulgar, articulación temporomandibular o articulación de la cara, anillo fibrosus, núcleo pulposus, núcleo pulposus espacio, intradiscally o transdiscally. Más preferentemente, la
30 inyección es una inyección intraarticular preferentemente en la rodilla, borde saliente, cadera, pulgar, articulación temporomandibular o articulación de la cara.

Adicionalmente preferentemente, la inyección intraarticular es una inyección intraarticular en el líquido sinovial de la articulación de la cara o la articulación temporomandibular. Una inyección preferida
 5 adicional es una inyección en el cuarto subsinovial o área o una inyección en el defecto condral u osteocondral. También abarcado es una inyección en el defecto condral u osteocondral antes o después del cierre del defecto con una membrana. La membrana puede ser, entre otras cosas, un
 10 periosteo o una membrana del colágeno. En otra modalidad preferida la membrana es una membrana que comprende del colágeno tipo I, tipo del colágeno III, porcino o colágeno tipo I de la rata o tipo III, ácido hialurónico o derivado de lo mismo. Una ventaja del cierre del defecto antes de
 15 la inyección de la formulación debe reducir la dilución de la formulación o que aumentar la concentración local del ingrediente activo de la formulación. La membrana adicionalmente actúa como el agente bioadhesivo para la unión de células.

20 Si la formulación proteínica se ha liofilizado, el material liofilizado es reconstituido primero en un líquido adecuado antes de la administración. El material liofilizado puede ser reconstituido en, p.ej, agua bacteriostático para inyección (BWFI), solución salina
 25 fisiológica, solución salina amortiguada con fosfato (PBS), una solución acuosa o la misma formulación en la cual la proteína tiene sido antes de la liofilización.

Las composiciones farmacéuticas para la inyección pueden presentarse en la forma de dosificación unitaria,
 30 p.ej, en ampolletas o en recipientes de la multidosis, con un conservante adicionado. Además, varios enfoques de la administración del fármaco recientes se han desarrollado y

las composiciones farmacéuticas de la presente invención son adecuadas para la administración al usar estos nuevos métodos, e. g., Inyectar-facilidad, Genject, plumas del inyector como Genen y dispositivos sin aguja como
5 MediJector y BioJector. La presente composición farmacéutica también puede adaptarse para aún para ser métodos de administración descubiertos. También ver Langer, 1990, Ciencia, 249: 1527-1533.

La composición farmacéutica también puede formularse
10 como una preparación de liberación lenta. Tales formulaciones de acción duradera pueden administrarse por el implante (por ejemplo subcutáneamente, en el ligamento o tendón, subsinovialmente o intramuscularmente), por la inyección subsinovial o por la inyección intramuscular.
15 Así, por ejemplo, las formulaciones pueden modificarse con materiales poliméricos o hidrofóbicos adecuados (por ejemplo como una emulsión en aceite aceptable) o resinas de intercambio iónico o derivados tan frugalmente solubles, por ejemplo, como una sal frugalmente soluble.

20 Las composiciones farmacéuticas también pueden estar en una variedad de formas de liberación lenta convencionales empleadas para la administración para proporcionar composiciones reactivas. Éstos incluyen, por ejemplo, sólido, semisólido y formas líquidas de
25 dosificación, como soluciones o suspensiones líquidas, suspensiones acuosas, geles, cremas, bálsamos, emulsiones, lociones, polvos, aerosoles, espumas, pastas, ungüentos, bálsamos, bálsamos y disminuciones.

Las composiciones farmacéuticas, de ser deseadas,
30 pueden presentarse en un vial, paquete o dispositivo del dosificador que puede contener uno o más formas de dosificación unitaria que contienen el ingrediente activo.

En una modalidad el dispositivo del dosificador puede comprender una jeringa que tiene una dosis única de la formulación líquida lista para inyectarse. La jeringa puede ser acompañada por instrucciones para la
5 administración.

La composición farmacéutica puede comprender además componentes farmacéuticamente aceptables adicionales. Otros portadores farmacéuticamente aceptables, excipientes o estabilizadores, como los descritos en las Ciencias
10 Farmacéuticas de Remington 16ta edición, Osol, A. El editor (1980) también puede incluirse en una formulación proteínica descrita aquí, a condición de que éstos no afecten negativamente las características deseadas de la formulación. Como se utiliza aquí, "el portador
15 farmacéuticamente aceptable" significa cualesquiera solventes, medios de dispersión, recubrimientos, agentes antibacterianos y antifúngicos, isotónicos y agentes de retraso de absorción, compatibles con la administración farmacéutica. El uso de tales medios y agentes para
20 sustancias farmacéuticamente activas es conocido en la técnica. Los portadores aceptables, los excipientes o los estabilizadores son no tóxicos a receptores en las dosis y concentraciones empleadas e incluyen: agentes amortiguadores adicionales; conservantes; cosolventes;
25 antioxidantes, incluyendo ácido ascórbico y metionina; agentes quelantes como EDTA; complejos metálicos (p.ej, Zn-complejos-proteínicos); polímeros biodegradables, como poliésteres; contraiones que forman la sal, como sodio, alcoholes polihídricos polihídricos; aminoácidos, como
30 alanina, glicina,

asparagina, de 2 fenilalaninas, y treonina; azúcares o alcoholes polihídricos, como lactitol, stachyose,

mannosa, sorbose, xilosa, ribosa, ribitol, myoinisitose, myoinisitol, galactosa, galactitol, glicerol, cyclitols (p.ej, inositol), polietilenglicol; azufre que contiene agentes reductores, como glutatión, thioctic ácido, tioglicolato de sodio, thioglycerol, [alfa]-monothioglycerol y sulfato del tiol de sodio; proteínas de bajo peso molecular, como albúmina sérica humana, albúmina sérica de bovino, gelatina u otras inmunoglobulinas; y polímeros hidrofílicos, como polivinilpirrolidona.

Las formulaciones descritas aquí son útiles como composiciones farmacéuticas en el tratamiento y/o la prevención de una enfermedad o trastorno en un paciente que lo necesita. El término "tratamiento" se refiere tanto a tratamiento terapéutico como a medidas profilácticas o preventivas. El tratamiento incluye la solicitud o la administración de la formulación al cuerpo, un tejido aislado o célula de un paciente que tiene una enfermedad/trastorno, un síntoma de una enfermedad/trastorno o una predisposición hacia una enfermedad/trastorno, con el objetivo de curar, cura, alivia, alivia, altera, remedia, mejora, mejora o afecta la enfermedad, el síntoma de la enfermedad o la predisposición hacia la enfermedad.

Aquellos "en la necesidad del tratamiento" incluyen a aquellos ya con el trastorno, así como aquellos donde el trastorno debe evitarse. El término "trastorno" es cualquier condición que se beneficiaría del tratamiento con la formulación proteínica descrita aquí. Esto incluye trastornos crónicos y agudos o enfermedades que incluyen aquellas afecciones patológicas que predisponen el mamífero al trastorno antes mencionado. Los ejemplos no limitantes de trastornos para someterse a tratamiento aquí

incluyen enfermedades degenerativas, hueso y/o cartílago y/o defecto del cartílago articular, una enfermedad inmunológica la inflamación preferentemente crónica de una articulación, hueso o tejido del cartílago como la

5 artritis (incluyendo entre otros la osteoartritis, la artritis reumatoide) y un trastorno medular como la enfermedad del disco degenerativa. En una modalidad preferida el trastorno medular es lumbago bajo idiopático, herniación del disco, interrupción del disco interna o

10 discos rasquebrajados, la radiculopatía, estenosis medular, hernió el núcleo ciática pulposus-inducida, ciática, escoliosis idiopática o mielopatía.

El término "degenerativas de enfermedades" significa enfermedades o defectos con la estructura del cartílago

15 disminuida como degeneración del cartílago o destrucción con o sin la participación de estructuras huesudas. Preferentemente, las enfermedades degenerativas son enfermedades del cartílago degenerativas. Éstos incluyen el trastorno conjunto temporomandibular (TMDs), acetabular

20 labrum trastornos, artritis, osteoartritis, artritis reumatoide, artritis psoriatica, artritis crónica juvenil, rhizomelic pseudoartritis, poliartritis reumatoide, enfermedad del disco degenerativa, defectos condrales u osteocondrales, defecto condral focal, defecto

25 osteocondral focal, defectos condrales superficiales, osteochondritis dissecans, grosor lleno defectos condrales, grosor parcial defectos condrales, chondromalacia, traumas asociados con los tendones y ligamentos en y alrededor de la articulación de rodilla,

30 el trauma del menisco lateral o medial, rupturas del menisco, lesión del ligamento crucial anterior, osteochondromatosis sinovial, espondilitis, espondilitis

anquilosante, sinovitis, villonodulal sinovitis.

El término "del cartílago de defecto" se refiere a cualquier anormalidad del cartílago que incluye enfermedades del cartílago, modificación del cartílago
5 causado p.ej por trauma o procesos degenerativos.

El término "articular del cartílago" recubre la superficie de la porción de huesos en articulaciones y funciones ya que un cojín entre dos huesos para permite el movimiento en articulaciones. El cartílago articular sano
10 normal se describe como el cartílago hialino. El cartílago articular comprende células especializadas (condrocitos) incrustados en una matriz de ricos materiales intracelulares en proteoglucanos, predominantemente aggrecan, tipo del colágeno fibrillas de I1, otras
15 proteínas y agua. La matriz se produce y mantenido por los condrocitos incrustados dentro de. El tejido del cartílago no es inervado y vascularizado y es alimentado por el tejido subyacente.

Además de la proteína CD-RAP, la composición
20 farmacéutica de la invención puede comprender adicional terapéutico o biológicamente activo - agentes. Por ejemplo, los factores terapéuticos útiles en el tratamiento de una indicación particular p.ej osteoartritis como uno o más inhibidores que se implican
25 en la destrucción de cartílago articular o componentes sinoviales no limitados con antimetaloproteinasas, compuestos de la ciclina, antagonistas de la citocina, corticosteroides, inhibidores del factor de necrosis tumoral, IL-inhibidores, sustancias antiangiogénicas,
30 agrecanasa inhibidores, p38 inhibidores de la cinasa, inhibidores de apoptosis, inhibidores de la hialuronidasa e inhibidores de enzimas proteolíticas pueden encontrarse.

Los factores que controlan la inflamación que incluye infliximab, etanercept, adalimumab, nerelimonmab, lenercept y lo similar, o combinaciones de lo mismo también pueden ser la parte de la composición. También es
 5 previsto que la composición liposomal farmacéutica puede incluir componentes de la matriz extracelulares como ácido hialurónico o unas sales de lo mismo derivadas que incluyen, éster, éster interno y derivados sulfatados, éster preferentemente parcial del ácido hialurónico.

10 En otra modalidad, la presente invención concierne a un kit (o artículo fabricado) o recipiente, que contiene una formulación de la invención. La formulación puede estar ya preferentemente en un estado líquido. Sin embargo, alternativamente, puede estar preferentemente en
 15 un estado liofilizado. También puede estar en un estado congelado, liofilizado, liofilizado o secado por aspersion. En consecuencia, si la formulación está en el estado además del líquido, puede prepararse por el practicante como la composición farmacéutica acuosa
 20 (líquida). Por ejemplo, la formulación puede liofilizarse y tendría que ser reconstituida luego. En consecuencia, el kit puede comprender además medios para la reconstitución de una formulación congelada, liofilizada, liofilizada o secada por aspersion y/o medios para diluir la formulación
 25 y/o medios para administrar la formulación o composición farmacéutica, respectivamente. El kit también puede ser acompañado por instrucciones de uso.

Así, un artículo fabricado se proporciona que contiene una formulación descrita aquí y preferentemente
 30 proporciona instrucciones a su uso. El artículo fabricado comprende un recipiente adecuado para contener la formulación. Los recipientes adecuados incluyen, entre

otras cosas, frascos, viales (p.ej, viales de la cámara
 duales), jeringas (p.ej, jeringas de la cámara
 individuales o duales), probetas, nebulizadores,
 inhaladores (p.ej, inhaladores de la dosis medidos o
 5 inhaladores del polvo seco), o almacenes. El recipiente
 puede formarse de una variedad de materiales, como el
 cristal, metálico o plástico (p.ej, polycarbonato,
 poliestireno, polipropileno, poliolefina). El recipiente
 agarra la formulación y el marcador, o asociado con, el
 10 recipiente puede indicar direcciones para reconstitución
 y/o uso. El marcador puede indicar adicionalmente que la
 formulación es útil o conceptualizado para la
 administración subcutánea. El recipiente que mantiene la
 formulación puede ser un vial de multiuso, que permite
 15 administraciones repetidas (p.ej, de 1-6 administraciones)
 de la formulación. El artículo fabricado puede comprender
 además un segundo recipiente que comprende un diluyente
 adecuado (p.ej, WFI, NaCl del 0,9%, BWFI, solución salina
 amortiguada con fosfato). Cuando el artículo fabricado
 20 comprenda una versión liofilizada de una formulación
 proteínica, el mezclado de un diluyente con la formulación
 liofilizada proporcionará una concentración proteica final
 en la formulación reconstituida de generalmente al menos
 20mg/mL. El artículo fabricado puede incluir
 25 adicionalmente otros materiales deseables desde un punto
 de vista comercial y punto de vista del usuario,
 incluyendo otros amortiguadores, diluyentes, filtros,
 agujas, jeringas, y envasar insertos con instrucciones de
 uso.

30 En otra modalidad de la invención, un artículo
 fabricado se proporciona que contiene la formulación
 acuosa de la presente invención y proporciona

instrucciones a su uso. El artículo fabricado comprende un recipiente. Los recipientes adecuados incluyen, por ejemplo, frascos, viales (p.ej, viales de la cámara duales), jeringas (como jeringas de la cámara duales),
5 pluma del autoinyector que contiene una jeringa y probetas. El recipiente puede formarse de una variedad de materiales tal como de cristal, plástico o policarbonato. El recipiente agarra la formulación acuosa y el marcador, o asociado con, el recipiente puede indicar el modo de
10 empleo. Por ejemplo, el marcador puede indicar que la formulación es útil o conceptualizado para la administración subcutánea. El recipiente que mantiene la formulación puede ser un vial de multiuso, que permite administraciones repetidas (p.ej, de 2-6 administraciones)
15 de la formulación acuosa. El artículo fabricado puede comprender además un segundo recipiente. El artículo fabricado puede incluir adicionalmente otros materiales deseables desde un punto de vista comercial y punto de vista del usuario, incluyendo otros amortiguadores,
20 diluyentes, filtros, agujas, jeringas, y envasar insertos con instrucciones de uso.

También incluido en la invención son dispositivos que se pueden usar para administrar la formulación de la invención. Los ejemplos de tales dispositivos incluyen,
25 entre otras cosas, una jeringa, una pluma, un implante, un dispositivo de inyección sin agujas, un dispositivo de la inhalación y un parche.

La invención es ilustrada adicionalmente por las Figuras y Ejemplos que son simplemente ilustrativos y no
30 se construyen como una limitación del alcance de la presente invención.

Breve Descripción de las Figuras

Figura 1: Factores que influyen en la estabilidad proteínica.

Figura 2: Medidas ejemplificantes que pueden realizarse para estabilizar una proteína.

Figura 3: Concentración sucesiva de RhCD-RAP en fosfato de potasio.

Figura 4: Concentración sucesiva de RhCD-RAP en cloruro TRIS

Figura 5: Concentración sucesiva de RhCD-RAP en cloruro de histidina.

Figura 6: Estabilidad de RhCD-RAP a elevada concentración en diferentes sistemas amortiguadores

Figura 7: Estabilidad de RhCD-RAP a elevada concentración en diferentes sistemas amortiguadores

Figura 8: Carga neta de glicina y RhCD-RAP en diferentes valores del pH

Figura 9: Influencia de pH en solubilidad de RhCD-RAP en 150 mM de glicina

Figura 10: Influencia de molaridad del fosfato de histidina en solubilidad de RhCD-RAP

Figura 11: Influencia del fosfato de histidina (ajustado a osmolalidad isotónica con cloruro de potasio) en solubilidad de RHCD-RAP

Por favor observe que en las Figuras 3-11, la numeración agregada a la leyenda del gráfico de barras pertenece a las barras de cada "bloque" mostrado en el cuadro (de izquierda a derecha). Por ejemplo, "0" pertenece a la barra izquierda externa, "1" pertenece a la barra al lado de la barra denotada con "0", etc.

Descripción Detallada de la Invención

Basado en consideración de los inventores concernientes a formulaciones estables de elevadas concentraciones de CD-RAP para permitir la inyección del volumen inferior para pacientes, que reduce efectos secundarios dolor similar debido a la inyección del alto volumen, diversas formulaciones se analizan en su efecto en la estabilización de la proteína de la CD-RAP. Algunas de estas formulaciones ejemplarmente se muestran en los siguientes ejemplos menor a. Sin embargo, como mencionado aquí, al comenzar con el objetivo de los inventores, es una materia del trabajo empírico para descubrir los ingredientes apropiados de una formulación que cumple el objetivo, ya que cada proteína tiene diferentes propiedades y así, uno no puede concluir de un ejemplo qué ingredientes son apropiado.

Ejemplo 1: diversos sistemas amortiguadores se analizan para el RHCD-RAP

EL RHCD-RAP se dializa contra 36 sistemas amortiguadores (50 mM de cloruro de potasio, 50 mM de cloruro de histidina o 50 mM de cloruro TRIS cada pH 6.0, cada amortiguador con o sin la adición de uno de los estabilizadores que siguen seleccionados de sacarosa, manitol, glicina, lisina y ácido glutámico con o sin 0.1% Tween® 20. Durante el proceso de concentración subsecuente por la diálisis hasta 30mg/mL del RHCD-RAP mediante filtración las muestras se analizan por UV/Vis.

Las formulaciones estables se someten a condiciones forzadas por ciclos de congelación-descongelación. Después de cada ciclo las muestras se centrifugan y el RHCD-RAP se cuantifica por UV/Vis.

Diálisis

2.0 el ml del material del volumen del RHCD-RAP (en 350 mM del pH de Arginina/Fosfato 7.4) se dializa contra 500mL del amortiguador deseado en 4°C más de 24 h bajo agitación moderada al usar un 6-8 tubo del límite del peso molecular kDa. Después 16to el amortiguador de la diálisis se cambia con 500mL del amortiguador recientemente preparado. Las soluciones de proteína resultantes se almacenan en el 2-8°C para el análisis adicional.

UV-VIS

El contenido protéico en muestras se determina mediante UV/Vis después de centrifugación del RhCD-RAP dializado durante 5 minutos en 13.000 rcf. Los amortiguadores de la muestra correspondientes servidos para la substracción en blanco. Para el cálculo de la concentración proteica [los mg/ml] la absorbancia en 280nm y la absorbancia específica del RHCD-RAP en 280nm [$1.649\text{mL} / (\text{mg} \cdot \text{cm})$] se usan.

Aumento de concentración de rhCD-RAP

EL RHCD-RAP dializado se transfiere en un 2mL concentrador centrífugo.

Después de etapas de centrifugación subsecuentes (4000 rcf, 4 °C) el volumen de solución de RHCD-RAP disminuida. El volumen de la solución del RHCD-RAP restante se determina y la concentración del RHCD-RAP se cuantifica por UV/Vis.

La termoestabilidad (Se congelan / Deshielo - ciclos)

La termoestabilidad del RHCD-RAP se evalúa al aplicar cinco se congelan/descongelan ciclos de 5 temperatura °C a-25 °C al usar un congelador profundo. La refrigeración y tasas de calentamiento es 1.0 °C/min con una etapa isotérmica de 15 minutos entre cada ciclo. Las soluciones de proteína se almacenan en 4°C - 8 °C hasta el análisis.

Una cantidad de 300µl de RHCD-RAP a una concentración de 30mg/mL se transfiere en viales de PP con un 1.5mL capacidad y sometido a condiciones forzadas por etapas de congelación-descongelación definidas como se describe
5 anteriormente.

Ejemplo 2: Estabilidad de RhCD-RAP en diferentes sistemas amortiguadores

Los efectos que se estabilizan de todos los sistemas
10 amortiguadores del Ejemplo 1 se determinan.

Sistemas del amortiguador de fosfato de potasio

Las sustancias que siguen se solucionan en WFI a un peso final de 1 kg que proporciona una concentración amortiguadores de 50 mm. El pH es ajustado al pH 6.0 por
15 la adición de KOH y HCl respectivamente.

a) 6,8g de fosfato de potasio, 12.4g de KCl con y sin 1.0g de Tween® 80

b) 6.8g de fosfato de potasio, 50g de sacarosa, 4.9g de KCl con y sin 1.0g de Tween® 80

20 c) 6.8g de fosfato de potasio, 50g de manitol, con y sin 1.0g de Tween® 80

d) 6.8g de fosfato de potasio, 25g de glicina, con y sin 1.0g de Tween® 80

e) 6.8g de fosfato de potasio, 25g de ácido
25 glutámico, con y sin 1.0g de Tween® 80

f) 6.8g de fosfato de potasio, 25g de lisina, con y sin 1.0g de Tween® 80

g) 61.0g de arginin, pH 7,4 ajustados con ácido fosfórico (control)

30 La isotonicidad de 300 - 400mOsm/kg se ajusta con cloruro de potasio, si se hiciera necesario. La osmolalidad de cada amortiguador se muestra en la Tabla 1.

Tabla 1: Osmolalidad de amortiguadores de fosfato de potasio

5	Formulación	Osmolalidad [mOsm/kg]
	50mM de Fosfato de potasio	345
10	50mM de Fosfato de potasio + 5% (p/v) de Sacarosa	340
	50mM de Fosfato de potasio + 5% (p/v) de Manitol	376
	50mM de Fosfato de potasio + 2.5% (p/v) de Glicina	371
	50mM de Fosfato de potasio + 2.5% (p/v) de Ácido glutámico	354
	50mM de Fosfato de potasio + 2.5% (p/v) de Lisina	302

El RhCD-RAP es dializado luego contra fosfato de potasio sistemas amortiguadores con base como enumerado en la Tabla 1 y concentrado por centrifugación en unidades de la filtración. Después de la reducción sucesiva definida del amortiguador el volumen prolongado de la solución de proteína se determina y la concentración del RHCD-RAP se cuantifica por UV/Vis. La Figura 3 muestra la concentración resultante de CD-RAP antes y después de la diálisis de 5mg/mL de una solución de CD-RAP así como después de la concentración a 10, 20 y 30mg/mL. El amortiguador de arginina/fosfato funcionó como un control.

Como se muestra en la Figura 3 la formulación en el sistema del amortiguador de arginina/fosfato mostró la solubilidad óptima en todas las etapas de concentración. Incluso en la etapa de concentración más elevada el contenido protéico cuantificado alcanzó el contenido teórico del RHCD-RAP. Así ya que no hay ninguna pérdida de la proteína en arginina/fosfato para el RHCD-RAP este amortiguador es una de las soluciones solubilisation más preferidas.

En contraste con arginina/fosfato el uso de fosfato de potasio ya que el amortiguador de la formulación requirió algunos suplementos suplementarios para alcanzar la solubilidad suficiente. Ya que 50 mM de fosfato de potasio (que comprende cloruro de potasio como el suplemento iónico para alcanzar la condición isotónica) mostraron la solubilidad adecuada sólo hasta 10mg/mL del RHCD-RAP, se necesita la adición de suplementos a fin de lograr la solubilidad a niveles de concentración de hasta 30mg/mL del RHCD-RAP y mayor. De la amplia gama de estabilizadores sólo la sacarosa da como resultado a una excelente solubilidad del RHCD-RAP incluso en una concentración de 30mg/mL. Los otros mostraron efectos de la agregación con la proteína precipitada parcialmente visible en diferentes etapas de concentración.

Sistemas del amortiguador de Tris

Cloruro de TRIS en la variación con estabilizadores sacarosa similar, manitol, glicina, ácido glutámico y lisina, con o sin Tween80® como el potenciador de la solubilidad se soluciona en WFI a un peso final de 1 kg, proporcionando una concentración amortiguadores de 50 mm. El pH se ajusta al pH 6.0 al usar HCl adicional respectivamente.

6.05g de base de TRIS, 9.7g de NaCl con y sin 1.0g de Tween® 80

6.05g de base de TRIS, 50g de sacarosa, 3.9g de NaCl con y sin 1.0g de Tween® 80

6.05g de base de TRIS, 50g de manitol, con y sin 1.0g de Tween® 80

6.05g de base de TRIS, 25g de glicina, con y sin 1.0g de Tween® 80

6.05g de base de TRIS, 25g de ácido glutámico, con y

sin 1.0g de Tween® 80

6.05g de base de TRIS, 25g de lisina, con y sin 1.0g de Tween® 80

La isotonicidad de 300-400mOsm/kg se ajusta con 5 cloruro de potasio, si se hiciera necesario. La osmolalidad de cada amortiguador se muestra en la Tabla 2.

Tabla 2: Osmolalidad de amortiguadores TRIS

	Formulación	Osmolalidad [mOsm/kg]
10	50mM de TRIS	342
	50mM de TRIS + 5% de Sacarosa	344
	50mM de TRIS + 5% de Manitol	378
	50mM de TRIS + 2.5% de Glicina	370
	50mM de TRIS + 2.5% de Ácido glutámico	350
	50mM de TRIS + 2.5% de Lisina	309

El RhCD-RAP se dializa y concentrado hasta 30mg/mL como 15 se describe para el amortiguador de fosfato de potasio anteriormente. 350 mM del amortiguador de fosfato de arginina funcionaron como un control para la solubilidad óptima.

Comparado con fosfato de potasio formulaciones amortiguadores con base todos los amortiguadores de cloruro 20 TRIS excepto 50 mM de cloruro TRIS con el 2,5% de ácido glutámico mostraron a baja solubilidad mayor que 5mg/mL de CD-RAP.

Sistemas del amortiguador de histidina

Cloruro de histidina (50 mM, pH 6.0) en la variación con 25 estabilizadores la sacarosa similar, el manitol, glicina, el ácido glutámico y la lisina, con o sin Tween80® como el potenciador de la solubilidad se analizan así al usar el mismo método que se describe anteriormente para los otros dos sistemas amortiguadores.

30 a) 7.76g de cloruro de la L-histidina, 12.4g de KCl con y sin 1.0g de Tween® 80

b) 7.76g de cloruro de la L-histidina, 50g de sacarosa,

4.9g de KCl con y sin 1.0g de Tween® 80

c) 7.76g de cloruro de la L-histidina, 50g de manitol, con y sin 1.0g de Tween® 80

d) 7.76g de cloruro de la L-histidina, 25g de glicina, con y sin 1.0g de Tween® 80

e) 7.76g de cloruro de la L-histidina, 25g de ácido glutámico, con y sin 1.0g de Tween® 80

f) 7.76g de cloruro de la L-histidina, 25g de lisina, con y sin 1.0g de Tween® 80

La osmolalidad se ajusta donde necesario. La osmolalidad final se muestra en la Tabla 3.

Tabla 3: Osmolalidad de amortiguadores de cloruro de histidina

Formulación del amortiguador	Osmolalidad [mOsm/kg]
50mM de Histidina	348
50mM de Histidina + 5% de Sacarosa	349
50mM de Histidina + 5% de Manitol	371
50mM de Histidina + 2.5% de Glicina	375
50mM de Histidina + 2.5% de Ácido glutámico	355
50mM de Histidina + 2.5% de Lisina	307

El RhCD-RAP se dializa en los sistemas amortiguadores y concentrado hasta 30mg/mL (compárese 4.1.1).

Tanto comparado con fosfato de potasio como comparado con cloruro de histidina de formulaciones amortiguadores con base TRIS los amortiguadores con base generaron los mejores resultados de la solubilidad del RHCD-RAP al lado del presente fosfato de arginina amortiguadores.

A excepción del hecho que 50 mM de histidina +/- Tween80® las mayores que concentraciones con agregados del 5mg/mL del RHCD-RAP, todos otros amortiguadores mostraron una solubilidad muy adecuada de hasta 30mg/mL en un amortiguador isotónico dentro de un pH de 6,0 y alrededor del pH neutro. Nuevamente, no hay ningún efecto en la

solubilidad de RhCD-RAP por el uso de Tween80® en los sistemas amortiguadores cuando analizado.

Conclusión

Los mejores resultados de CD-RAP que proporciona elevada concentración de la proteína de hasta 30mg/mL sin la agregación son lo siguiente: a) 50 mM de fosfato de potasio con sacarosa del 5%, b) 50 mM de cloruro TRIS, el 2,5% de ácido glutámico, c) 50 mM de histidina, glicina del 2,5%, d) 50 mM de histidina, el 2,5% de ácido glutámico, e) 50 mM de histidina, lisina del 2,5%, f) histidina con manitol del 5% y 350 mM g) de fosfato de arginina.

Disminuir la concentración deseada a 5mg/mL para casi todas las formulaciones analizadas permitió la estabilidad protéica mientras que el levantamiento de la concentración a 30mg/mL permitió a la barrera despejarse.

Ejemplo 3: Evaluación de termoestabilidad de RhCD-RAP en diferentes sistemas amortiguadores por ciclos de congelación-descongelación

El ejemplo 1 evaluó 7 formulaciones amortiguadores para su capacidad de concentrar al RHCD-RAP hasta 30mg/mL a pH 6.0. Estas formulaciones se analizan donde se mantienen la estabilidad de RHCD-RAP bajo situaciones de la tensión es decir se congelan/descongelan la ciclización.

El RhCD-RAP se dializa en sistemas amortiguadores (a) 50 mM de fosfato de potasio con la sacarosa del 5%, b) 50 mM de cloruro TRIS, el 2,5% de ácido glutámico, c) 50 mM de histidina, glicina del 2,5%, d) 50 mM de histidina, el 2,5% de ácido glutámico, e) 50 mM de histidina, lisina del 2,5%, f) histidina con el manitol del 5%, g) 350 mM de

fosfato de arginina y posteriormente concentrado por centrifugación en unidades de la filtración a concentraciones de ~ 30mg/mL del RHCD-RAP. 300µl se transfieren en viales de PP con un 1.5mL capacidad. Las
 5 formulaciones se someten a condiciones forzadas por 5 se congelan/descongelan ciclos, el RHCD-RAP con agregados se elimina después por centrifugación y el RhCD-RAP soluble restante se cuantifica por UV/Vis.

EL RHCD-RAP es exitosamente concentrado a
 10 aproximadamente 30mg/mL en todos los sistemas amortiguadores analizados..

La Figura 6 no muestra ningún efecto negativo en la concentración proteica por ciclos de congelación-descongelación en todas las formulaciones excepto el RHCD-
 15 RAP en 50 mM de fosfato de potasio/5 sacarosa de %. Sólo cuando en 50 mM de fosfato de potasio/5 sacarosa de % podría una disminución significativa del RHCD-RAP observarse después de que los terceros se congelan/descongelan el proceso y temporalmente una leche
 20 nublada la dispersión similar es visible. En todas otras formulaciones la solución es traslúcida después de cada se congelaré/descongelaré el ciclo, que combinado con los resultados de la cuantificación de RhCD-RAP por UV/Vis solucionó el problema de la solubilidad y la estabilidad
 25 del RHCD-RAP en elevadas concentraciones.

Sorprendentemente sólo almacene en un buffer sistemas que comprendieron de al menos un aminoácido dio como resultado la termoestabilidad del RHCD-RAP después de que congelan y descongelan la ciclización.

30

Ejemplo 4: Estabilización de efecto de diferentes aminoácidos en RhCD-RAP (30mg/mL)

Ya que el Ejemplo 2 y 3 mostró la excelente solubilidad del RHCD-RAP en concentraciones de 30mg/mL en soluciones amortiguadoras que contienen aminoácidos este efecto aminoacídico especial se examina en el siguiente
5 ejemplo.

Los aminoácidos alcalinos como histidina y arginina así como aminoácidos neutros como glicina y aminoácidos ácidos como el ácido glutámico se analizan en su efecto de estabilización en el RHCD-RAP.

10 Todas las soluciones a granel se diseñan isotónicas a pH 6.0 sin la adición de cualquier sal u otros excipientes; el pH se ajusta tanto con ácido clorhídrico como con ácido fosfórico. Además 350 mM de fosfato de arginina se analizan a pH 6.0 y pH 7.4.

15 **Tabla 4: RhCD-RAP sometido a condiciones forzadas por ciclos de congelación-descongelación en diferentes amortiguadores**

20	Formulación	Osmolaridad [mOsm/kg]
	300mM de Cloruro de L-histidina a pH 6	330
	300mM de Fosfato de L-histidina a pH 6	303
	350mM de cloruro de arginina a pH 6	302
	350mM de fosfato de arginina a pH 6	310
	350mM de fosfato de arginina a pH 7.4	300
	300mM de glutamato del potasio a pH 6	337
	150mM de glicina a pH 6	326

El RhCD-RAP se dializa en sistemas amortiguadores
25 (enumerado en la Tabla 4) y es concentrado posteriormente por centrifugación en unidades de la filtración a una concentración de ~30mg/mL del RHCD-RAP. 300µl se transfieren en viales de PP con un 1.5mL capacidad.

30 Las formulaciones enumeradas en la Tabla 4 se someten a condiciones forzadas por 5 se congelan/descongelan ciclos según los Ejemplos

anteriormente. El RHCD-RAP con agregados se elimina después por centrifugación y el RhCD-RAP soluble restante se cuantifica por UV/Vis.

La Figura 7 muestra que el excelente efecto de
5 estabilización de todos los sistemas amortiguadores analizados y la solubilidad del RHCD-RAP en se congelan/descongelan ciclos excepto uno: RhCD-RAP dializado en 150 mM de glicina con agregados cuantitativamente durante la etapa dialyzing. Así
10 glicina a pH 6.0 como el único aminoácido no cargado analizado indica que la carga del aminoácido es una propiedad técnica importante en el uso de aminoácidos para la preparación de amortiguadores del volumen del RHCD-RAP. Sin embargo, tanto fosfato como amortiguador
15 de cloruro llevado a cabo en la misma manera.

Ejemplo 5: Efecto de diferentes pH mediante solubilidad de RhCD-RAP en glicina

El ejemplo 4 señaló a una baja solubilidad del
20 RHCD-RAP en soluciones de glicina isotónicas a pH 6,0 debidos a su comportamiento neutro. Los inventores luego determinaron la consecuencia de la solubilidad de CD-RAP si glicina todavía se no carga pero el RHCD-RAP comprende una carga neta más elevada debido a un cambio
25 del pH y una carga neta más elevada de CD-RAP respectivamente.

La Figura 8 ilustra la carga neta tanto de glicina como de RhCD-RAP en los diferentes valores del pH debido a sus valores de pKs. En este experimento el
30 RHCD-RAP se dializa contra 150 mM de glicina a pH 4.0, pH 6.0 y pH 8.0. Los valores del PH se ajustan con hidróxido de sodio y ácido fosfórico respectivamente.

El RhCD-RAP que se dializa en un amortiguador de pH 6 y pH 8 mostró una tendencia concentrada a la agregación. Estas soluciones tienen un aspecto similar en contraste con glicina (pH 4) donde la solución todavía muestra un aspecto similar traslúcido no lechoso.

El RhCD-RAP se concentra a 30mg/mL (pH 4.0) y es sometido a condiciones forzadas posteriormente por 5 se congelan/descongelan ciclos en consecuencia. El RHCD-RAP con agregados se elimina después por centrifugación y el RhCD-RAP soluble restante se cuantifica por UV/Vis. las soluciones de RHCD-RAP a pH 6.0 y pH 8.0 son directamente sometidas a condiciones forzadas en concentraciones inferiores a consecuencia del filtro que se obstruye durante el procedimiento de concentración.

La Figura 9 muestra el efecto del RHCD-RAP que se autoestabiliza en condiciones ácidas p.ej bajo el pH 4,0 debidos al levantamiento de la carga neta de la proteína. Aunque glicina se no cargue a pH 4.0 es posible lograr una solubilidad suficiente del RHCD-RAP.

Mientras que en el intervalo de pH entre el pH 6 - 8 formulaciones que comprenden al CD-RAP deben comprender de aminoácidos cargados como un excipiente que se estabiliza, en el pH inferior p.ej pH 4,0 RhCD-RAP es capaz de estabilizarse sin la adición de aminoácidos cargados.

Ejemplo 6: Efecto de histidina en RhCD-RAP que se estabiliza

Los experimentos anteriores demostraron aminoácidos cargados como una herramienta potente para la estabilización de RHCD-RAP para elevadas

concentraciones de hasta 30mg/mL en el pH aproximadamente neutro como el pH 6.0. Para determinar el intervalo de los amortiguadores identificados este Ejemplo muestra la dependencia de la concentración del componente amortiguadores para el CD-RAP para mejor apropiadamente ejemplificarse para histidina. Por lo tanto, el RHCD-RAP se dializa en el fosfato de histidina en el intervalo de 0mM de a 300 mM de histidina como se muestra en la Tabla 5 menor a. Además, estas formulaciones se ajustan a la osmolalidad fisiológica mediante la adición de cloruro de potasio de la cantidad suficiente.

Tabla 5: diferentes concentraciones de amortiguadores de L-histidina, osmolalidad antes del ajuste con cloruro de potasio en condiciones isotónicas

Histidina [mM]	Cloruro de potasio [mM]	Osmolalidad [mOsmol/kg]
0	0	2
0	150	295
50	0	67
50	116,5	298
100	0	121
100	89.5	302
200	0	215
200	42,5	302
300	0	299

El RhCD-RAP se concentra a 30mg/mL (pH 6.0) y posteriormente sometido a condiciones forzadas por 5 se congelan/descongelan ciclos. El RHCD-RAP con agregados se elimina después por centrifugación y el RhCD-RAP soluble restante se cuantifica por UV/Vis.

La Figura 10 demuestra que la solubilidad del RHCD-RAP en el fosfato de histidina a pH 6.0 es estrictamente dependiente de la concentración de histidina. Mientras que 0mM de histidina a pH 6.0 dejó de estabilizar al RHCD-RAP, las concentraciones más elevadas dieron como resultado a la solubilidad considerablemente mejorada en la

86

correlación al aumento de la molaridad de histidina. Éstos repitieron que freeze/thaw-experiments han mostrado que los amortiguadores que comprenden la L-histidina en concentraciones de 200 mmol/l y soluciones del RHCD-RAP
 5 estables más proporcionadas en 30mg/mL.

Como observado en la Figura 11 la adición de cloruro de potasio no influyó en la solubilidad del RHCD-RAP en el fosfato de histidina. Por lo tanto, un ajuste a la osmolalidad isotónica de una formulación de CD-RAP
 10 farmacéutica con cloruro de potasio puede usarse sin un impacto negativo en la solubilidad y la estabilidad del RHCD-RAP en elevadas concentraciones.

Ejemplo 7: Inhibición de actividad de ALP inducida
 15 por GDF-5

Las células de MCHT se siembran en una densidad de 30.000 células por pocillo en placas de 96 pocillos y se cultivan durante la noche en el medio de cultivo (alfa-MEM que contiene glutamina completada con FCS del 10%). Al día
 20 siguiente, el estímulo con rhGDF-5 y RhCD-RAP se inicia al cambiar el medio de cultivo en cada pocillo a 160µl del medio del estímulo particular. Todos los patrones y las muestras se llevan a cabo en cuadrillizos. Una dilución en serie de rhGDF-5 con las concentraciones que siguen de
 25 rhGDF-5 (1200ng/ml, 400ng/ml, 133.2ng/ml, 44.5ng/ml, 14.8ng/ml rhGDF-5 en el medio de cultivo completo) se prepara para lograr una curva estándar o de distribución normal. Para el análisis de la inhibición rhCD-RAP-mediated de la actividad de ALP las células se co-
 30 estimulan con 400ng/ml rhGDF-5 y 1 a 10µM rhCD RAP. Las células se cultivan dentro del medio del estímulo durante tres días antes de que éstos se lisen agregando 0.2g de

MgCl₂ x 6H₂O en 2mL Nonidet P40 e incubando para 16 h en una incubadora. 50µl del producto de la lisis se transfieren a una nueva placa de 96 pocillos y 50µl amortiguador del sustrato (0.222g de PNPP en el
 5 amortiguador de dietanolamina, Pierce) se agregan e incubado durante 45 minutos en 37°C. Después la reacción es detenida agregando 0,5 m NaOH. La absorbancia se cuantifica en 405nm en un lector de la placa. La actividad de ALP de referencia se cuantifica en células no tratadas
 10 y se resta de todos los patrones y muestras. La curva de la norma se utiliza calculan la actividad de ALP en todas las muestras.

Ejemplo 8: estímulo de CD-RAP de condrocitos y
 15 análisis con qRT-PCR

Los condrocitos se aíslan del cartílago articular humano derivado de pacientes que experimentan al reemplazo de la rodilla total. El cartílago se corta del hueso y en pequeños pedazos. Las unidades de producto del cartílago
 20 se digieren con Pronase del 1% en DMEM/F12 que contiene la Penicilina/Estreptomicina del 1% en 37°C para 1h. Después de centrifugación en 200 xg de durante 5 minutos a temperatura ambiente, las unidades de producto del cartílago se lavan una vez con PBS. Éstos se digieren en
 25 Colagenasa del 0,07% un en el medio de cultivo (DMEM/F12 completado con FCS del 10% y Penicilina/Estreptomicina del 1%) en 37°C durante la noche. Al día siguiente la suspensión celular se filtra sucesivamente a través de 100, 70 y 40µm tamices celulares. Las células se hacen
 30 girar abajo, suspendidas de nuevo en el medio de cultivo y sembradas en 6 placas del pocillo en una densidad de 250.000 células por pocillo. Las células se cultivan en

37°C, CO₂ del 5% y humedad del 90% hasta éstos confluencia alcanzada (aproximadamente 1 semana). El medio se cambia cada dos días.

Para el estímulo con el CD-RAP, las células se privan
5 de comida en el medio sin sueros durante la noche. El CD-RAP (0.5 - 5µM) se agrega en DMEM/F12 sin sueros y las células se cultivan para el 24to. Posteriormente, las células se lisan y ARN se extrae con RNeasy Mini Kit según las instrucciones del fabricante. 1µg ARN se utiliza
10 preparan el ADNc con la Transcripción inversa de QuantiTect Kit (Qiagen). El PCR DE TEMPERATURA AMBIENTE se lleva a cabo con 4µl ADNc diluido (diluido 1:5), 10µl QuantiFast SYBR Mezcla del PCR Verde (Qiagen), 4µl agua sin nucleasas y 2µl mezcla de cebadores, 50 ciclos en una
15 ciclizador de luz en condiciones convencionales. Los cebadores que siguen se usan: 18SrRNA (Qiagen, Ensayo del Cebador de QuantiTect QT00199367, MMP13delantero GGGTTCCTGA TGTGGGTGAA TA (SEQ ID No. 5), MMP13inverso GCCATCGTGA AGTCTGGTA (SEQ ID No. 6). Los resultados se
20 normalizan al ARNr de 18 bp.

REIVINDICACIONES

1. Una formulación acuosa estable que comprende al menos 5mg/mL de CD-RAP y un aminoácido cargado, donde la proteína CD-RAP se disuelve directamente en esa parte.

5 2. La formulación según la reivindicación 1, donde el aminoácido tiene una carga neta a un pH entre aproximadamente 6 y 8.

3. La formulación según cualquiera de las reivindicaciones precedentes, donde comprende un
10 amortiguador.

4. La formulación según cualquiera de las reivindicaciones precedentes, donde comprende un modificador de la tonicidad.

5. La formulación según cualquiera de las
15 reivindicaciones precedentes, donde comprende un estabilizador.

6. La formulación según cualquiera de las reivindicaciones precedentes, donde comprende además un excipiente.

20 7. La formulación según cualquiera de las reivindicaciones precedentes, donde la formulación tiene un pH entre aproximadamente 6 y 8.

8. La formulación según la reivindicación 1, donde el aminoácido cargado se selecciona a partir del grupo que
25 comprende arginina, histidina, lisina y ácido glutámico.

9. La formulación según cualquiera de las reivindicaciones precedentes, donde puede congelarse en seco, liofilizarse o secarse por aspersión.

10. La formulación según cualquiera de las
30 reivindicaciones precedentes, donde los ingredientes de la formulación proporcionan la estabilidad sobre ciclos repetidos de congelamiento-deshielo.

11. La formulación según cualquiera de las reivindicaciones precedentes para usarla en terapia.

12. La formulación según cualquiera de las reivindicaciones precedentes para usarla en el tratamiento
5 contra trastornos inflamatorios, preferentemente osteoartritis.

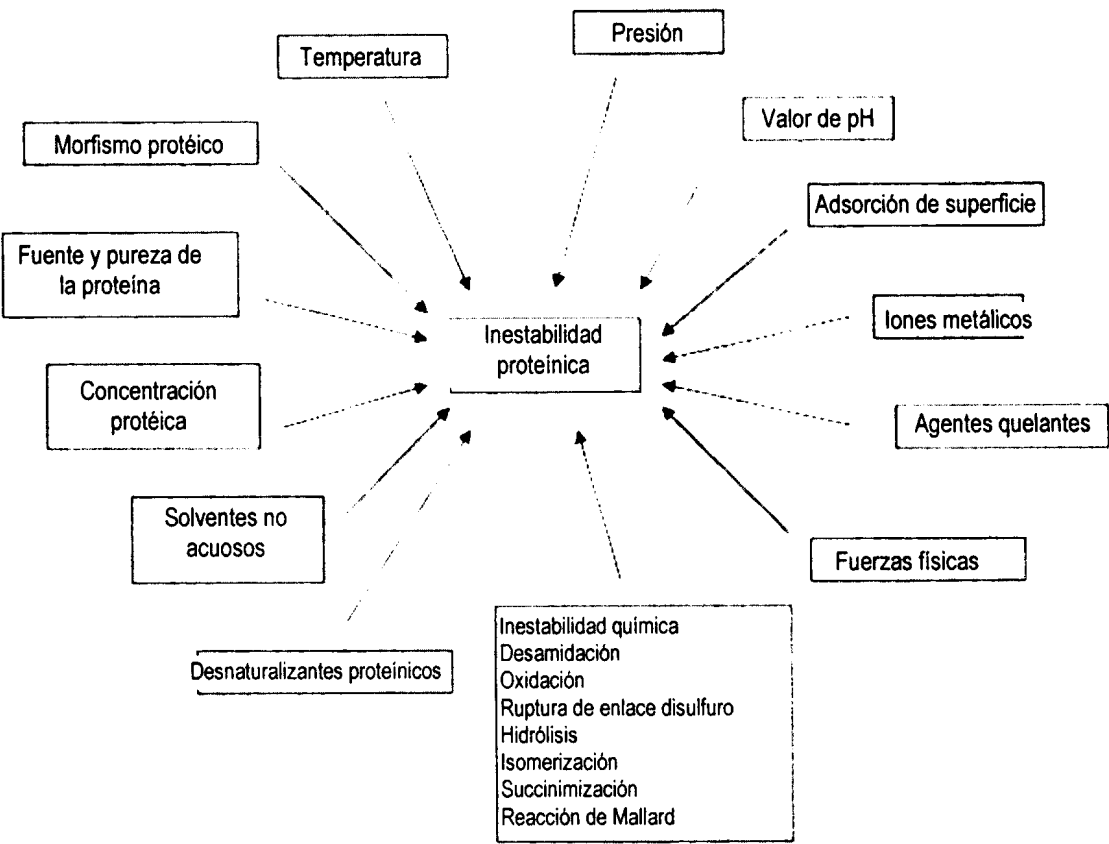
13. Un kit que comprende la formulación según cualquiera de las reivindicaciones precedentes.

14. La formulación según cualquiera de las
10 reivindicaciones precedentes que comprende al menos 30mg/mL de CD-RAP y donde el amortiguador se selecciona a partir del grupo que comprende fosfato de potasio, cloruro de TRIS, histidina, arginina y glutamato y el aminoácido se selecciona a partir del grupo que comprende aspartato,
15 glutamato (preferentemente fosfato de glutamato), arginina (preferentemente fosfato de arginina o cloruro de arginina), histidina (preferentemente cloruro de histidina o fosfato de histidina), lisina y glicina.

15. La formulación según cualquiera de las
20 reivindicaciones precedentes que comprende al menos 30mg/mL de CD-RAP y

- (i) 50 mM de cloruro TRIS y 2.5% de glutamato;
- (ii) 50 mM de histidina y 2.5% (p/v) de glicina, 2.5% (p/v) de glutamato o 2.5% (p/v) de lisina;
- 25 (iii) 300 mM de de cloruro de histidina a pH 6.0;
- (iv) 50, 100, 200 o 300 mM de fosfato de histidina a pH 6.0;
- (v) 350 mM de cloruro de arginina a pH 6.0;
- (vi) 350 mM de fosfato de arginina a pH 6.0;
- 30 (vii) 350 mM de fosfato de arginina a pH 7.4; o
- (viii) 300 mM de glutamato de potasio a pH 6.0.

Figura 1



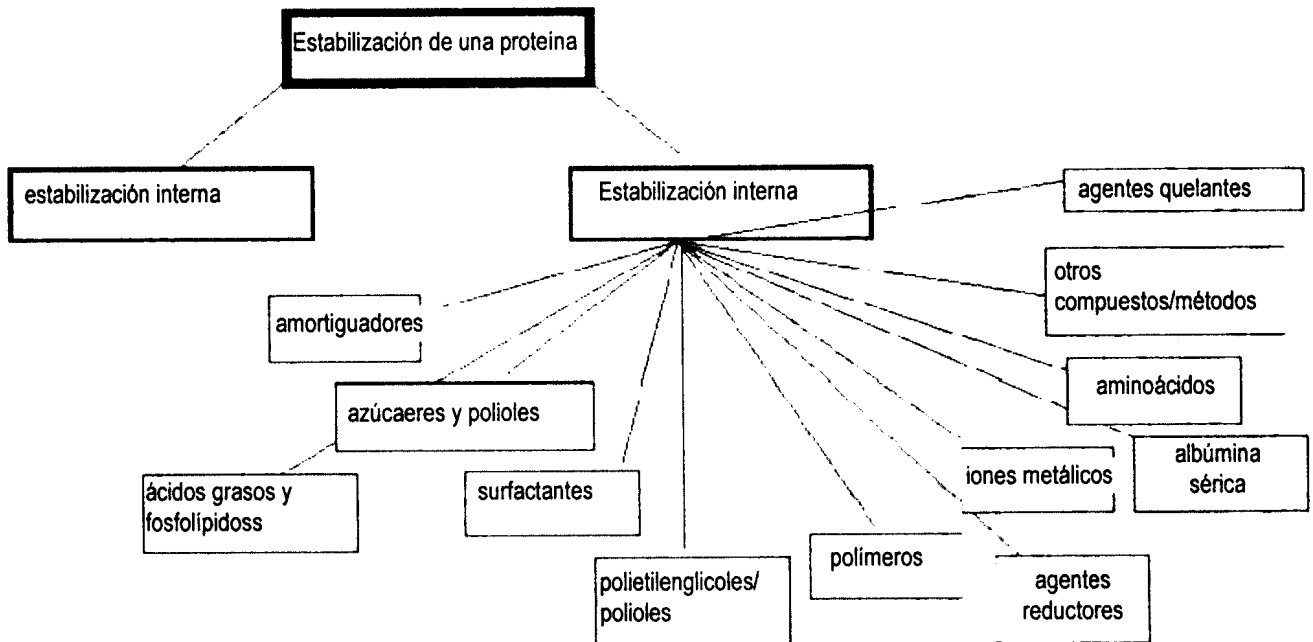


Figura 2

Figura 3
concentración de rhCD-RAP en sistemas amortiguadores K-PO4

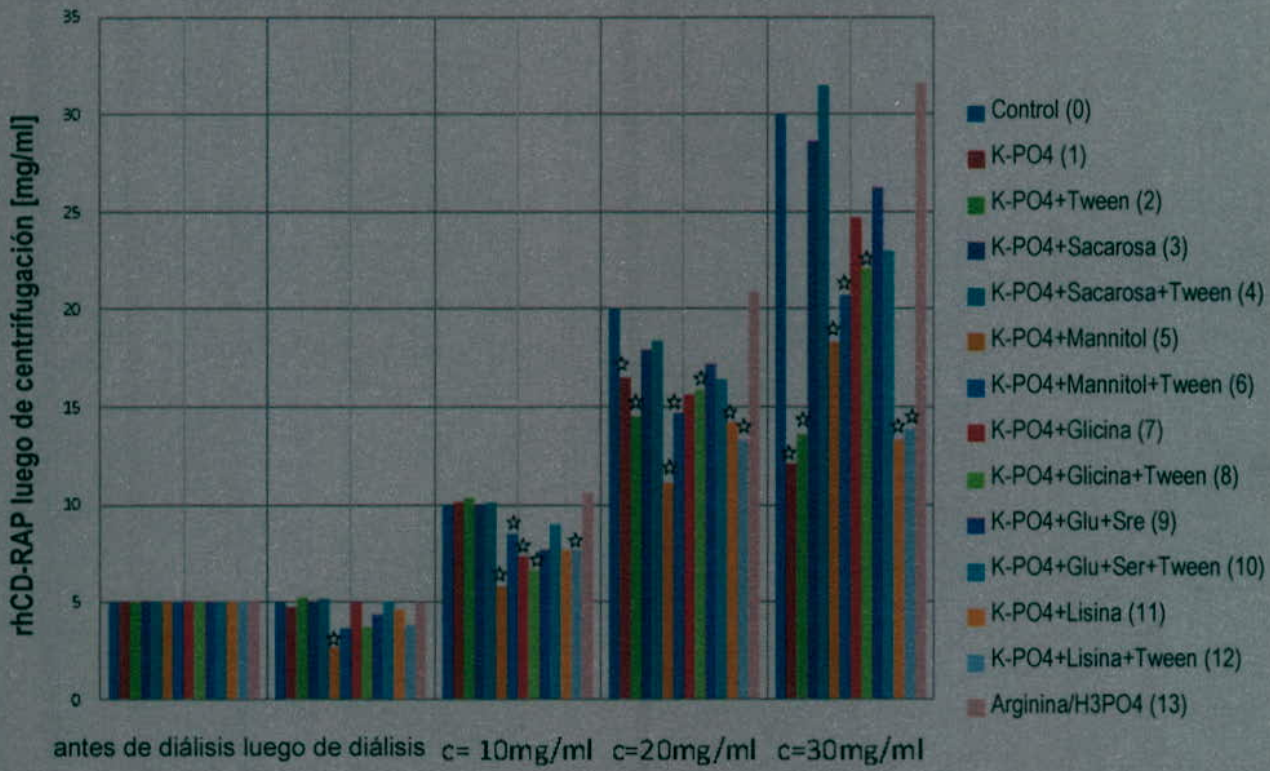


Figura 4

concentración de rhCD-RAP en sistemas amortiguadores Tris-Cl

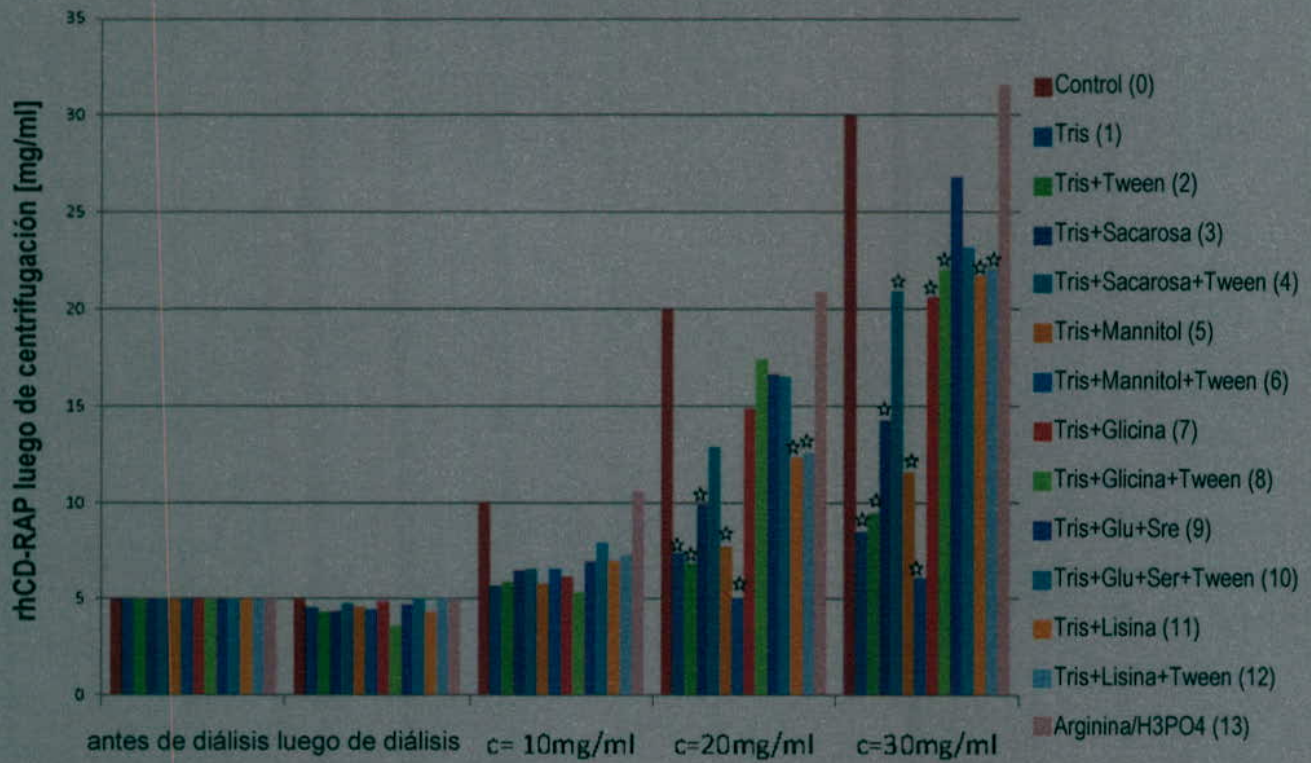


Figura 5

concentración de rhCD-RAP en sistemas amortiguadores Histidina-Cl

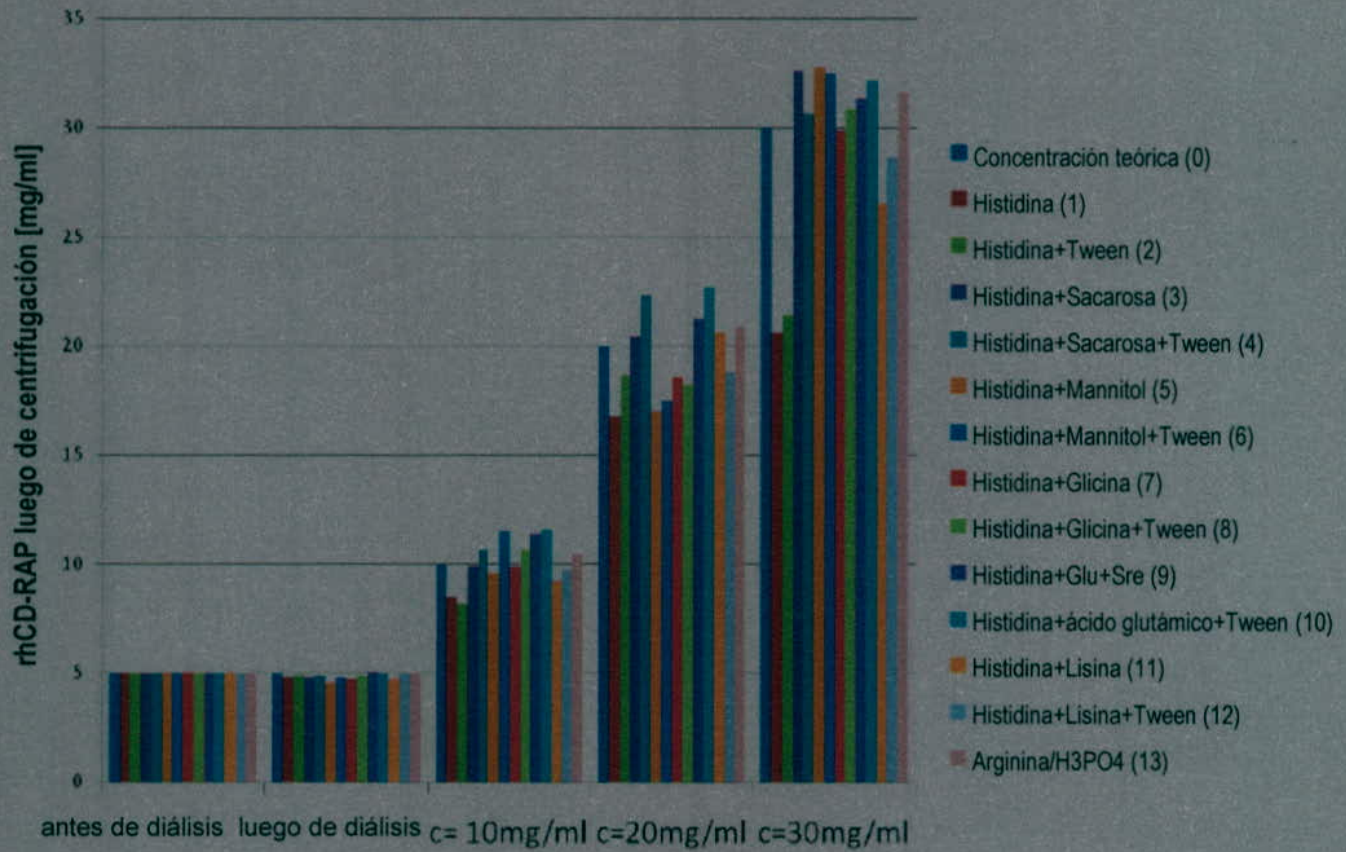


Figura 6

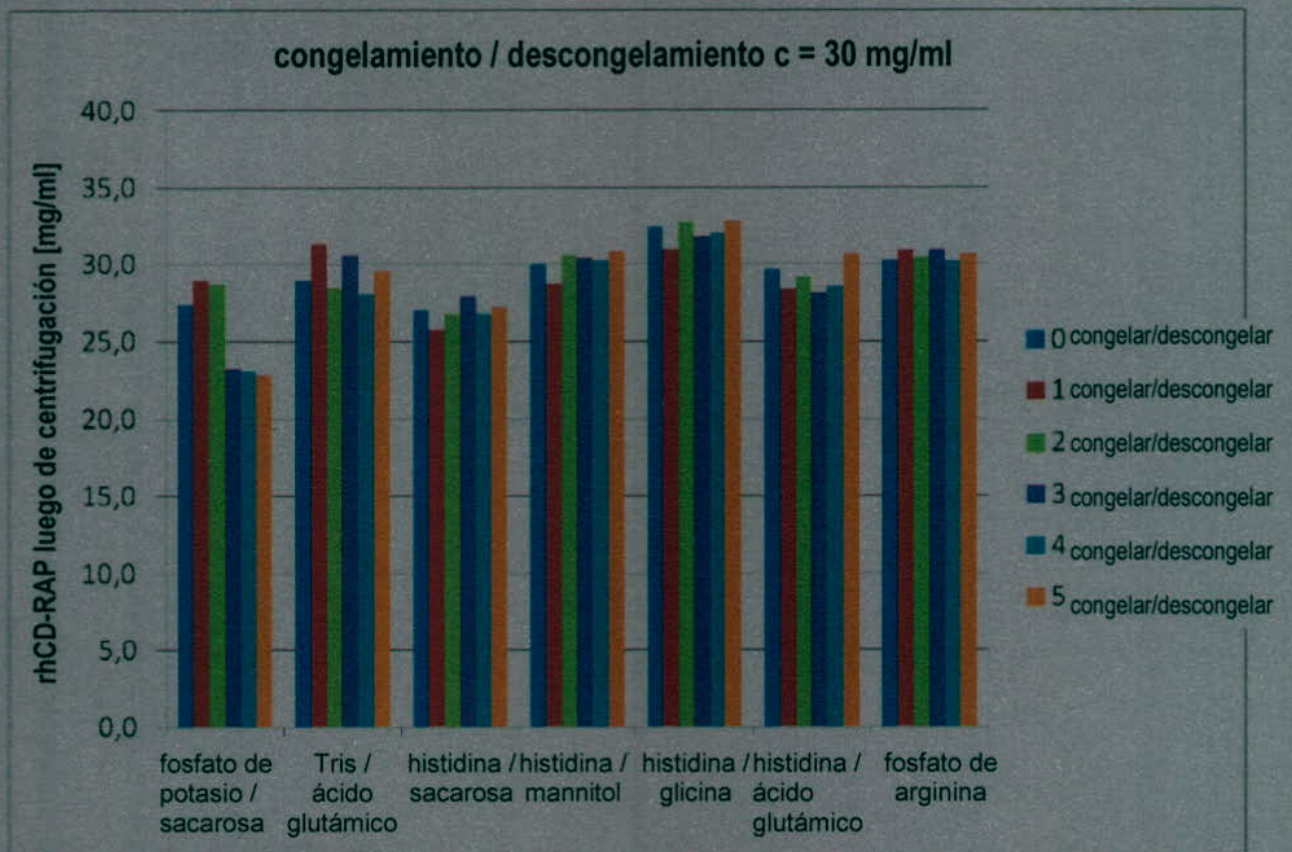


Figura 7

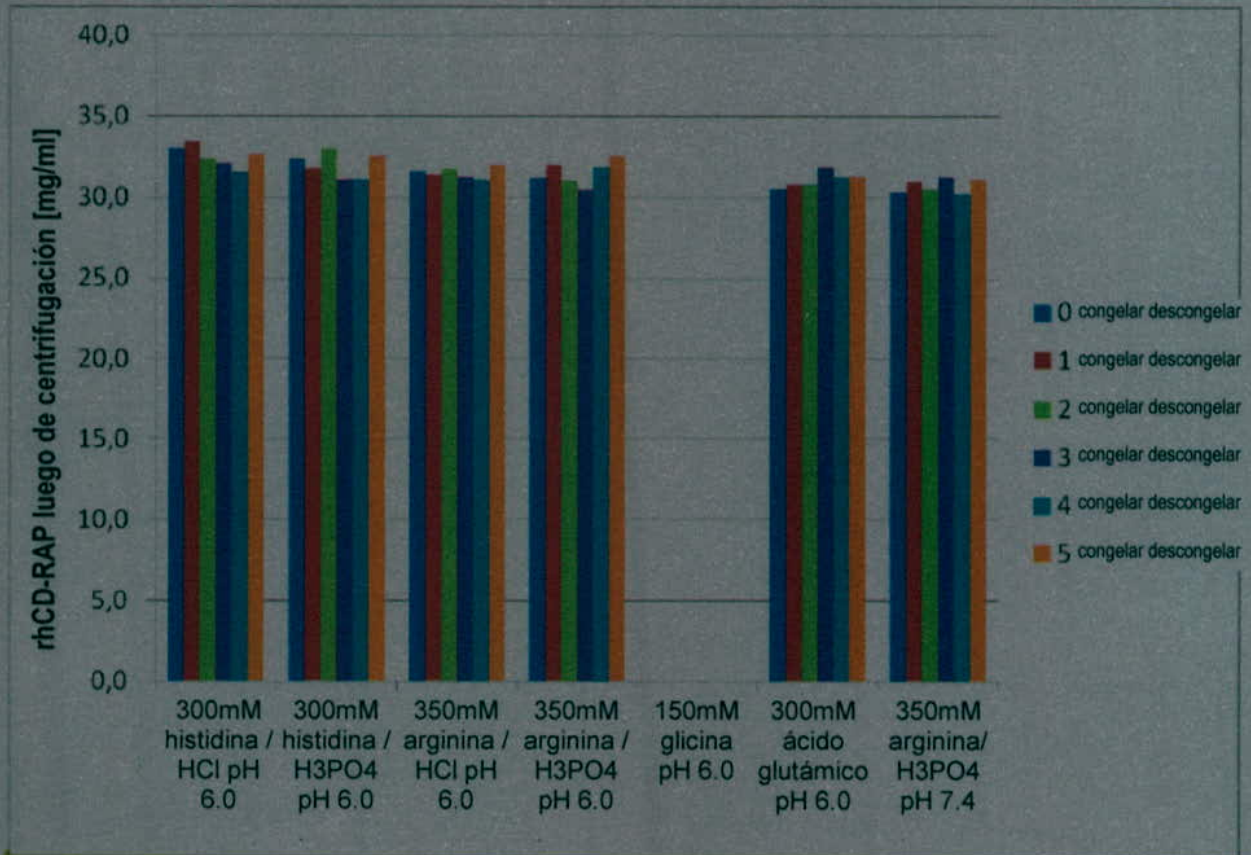


Figura 8

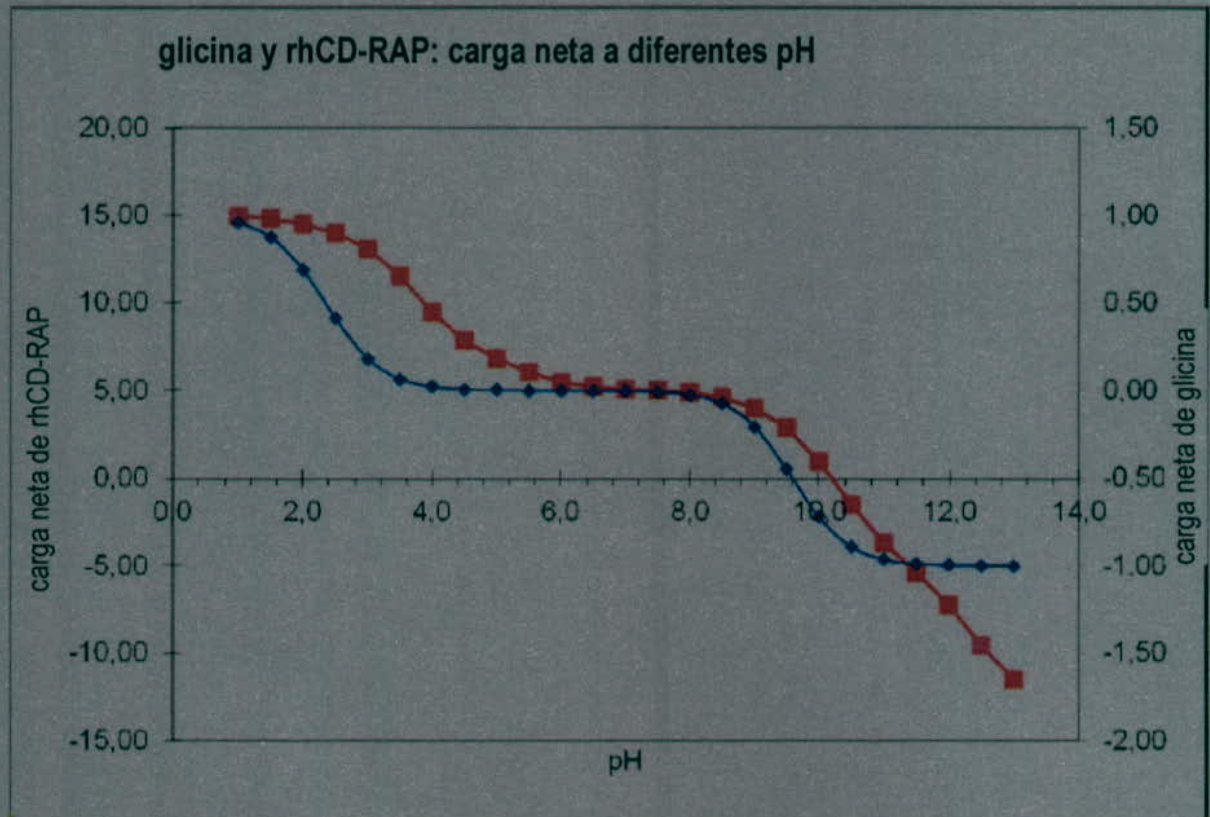


Figura 9

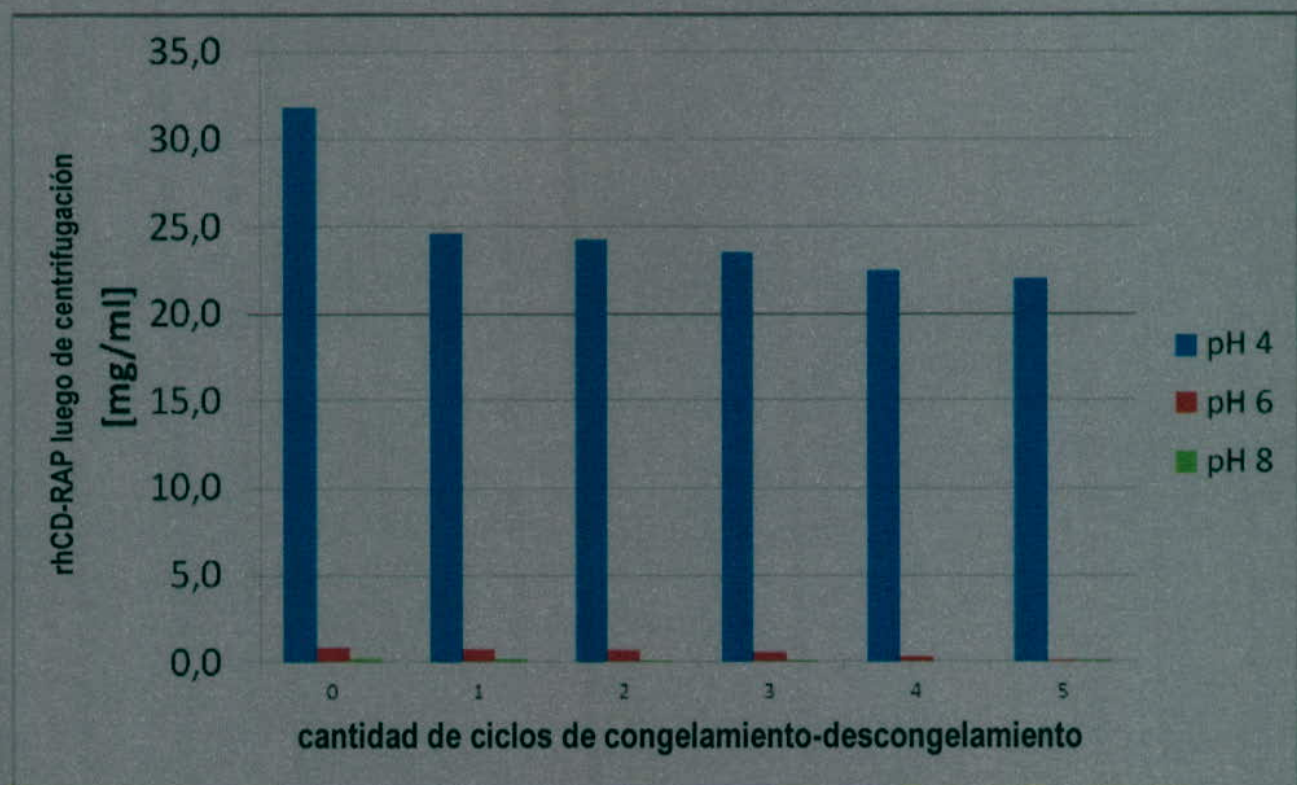


Figura 10

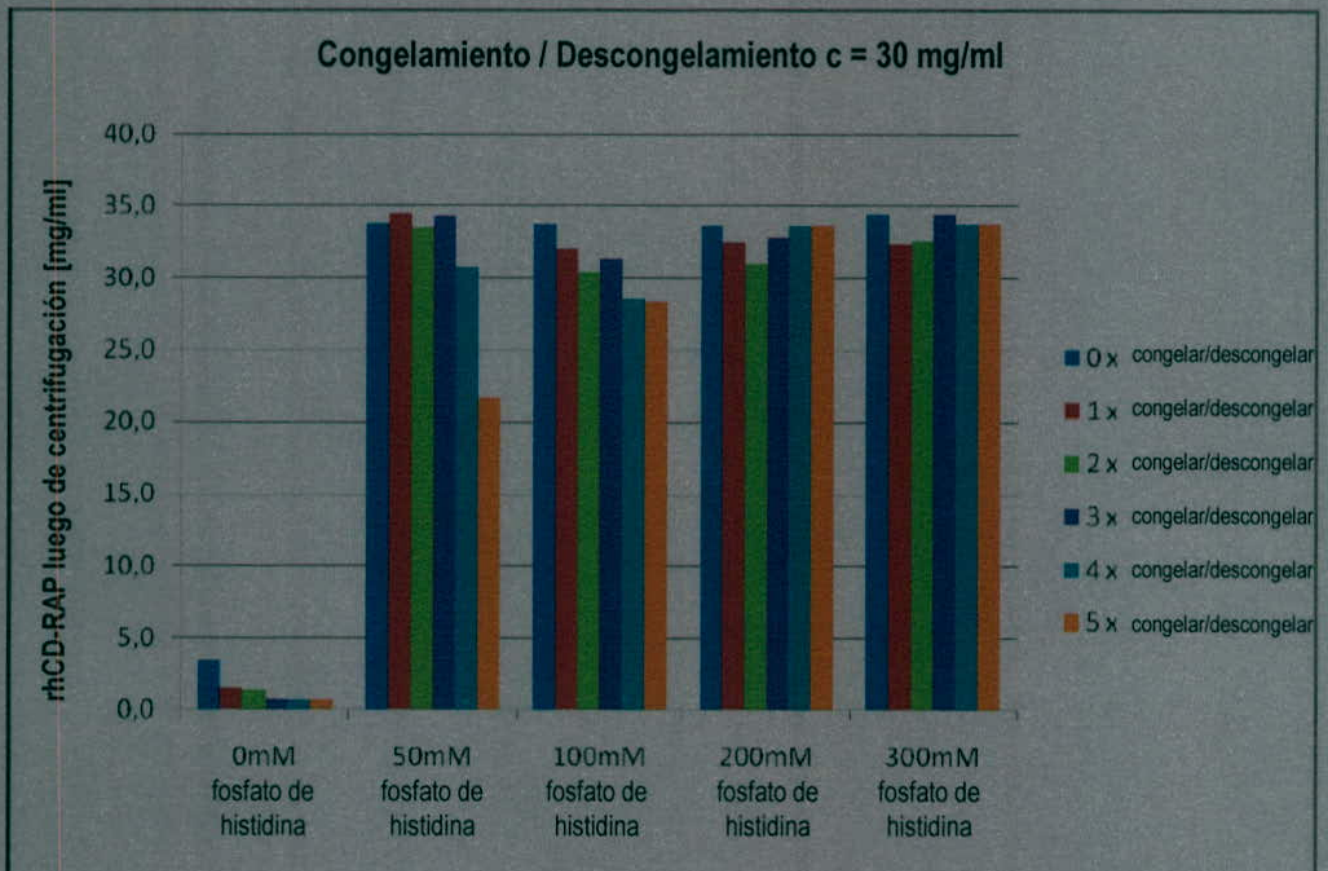
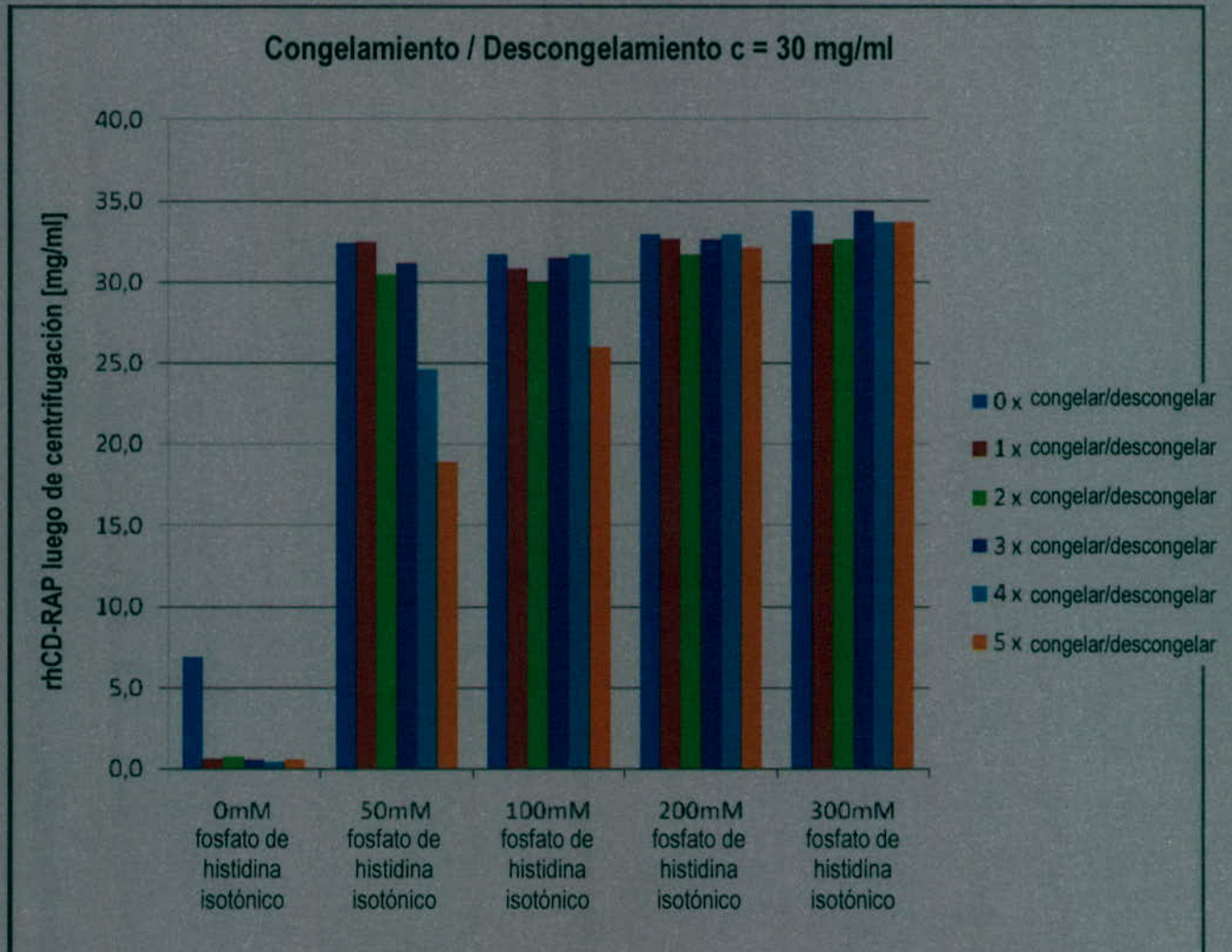


Figura 11



RESUMEN

La presente invención se relaciona con formulaciones acuosas estables que comprenden al menos 5mg/mL de CD-RAP y un aminoácido cargado, el aminoácido tiene
5 preferentemente una carga neta a un pH entre aproximadamente 6 y 8. Los ingredientes de la formulación preferentemente proporcionan estabilidad sobre ciclos repetidos de congelamiento-deshielo. En un aspecto preferido, la formulación es para usarse en terapia,
10 preferentemente para usarse en el tratamiento contra trastornos inflamatorios, preferentemente osteoartritis. Más aún, se proporciona un kit que comprende la formulación de la invención.

15

20

25

LISTA DE SECUENCIAS

<110> Scil Technology GmbH
 5 <120> Formulaci3n de MIA/CD-RAP estable
 <130> SCI13586PCT
 10 <150> EP10161160.6
 <151> 2010/04/27
 <160> 6
 <170> PatentIn versi3n 3.5
 15 <210> 1
 <211> 107
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 20 <400> 1
 Gly Pro Met Pro Lys Leu Ala Asp Arg Lys Leu Cys Ala Asp Gln Glu
 1 5 10 15
 25 Cys Ser His Pro Ile Ser Met Ala Val Ala Leu Gln Asp Tyr Met Ala
 20 25 30
 30 Pro Asp Cys Arg Phe Leu Thr Ile His Arg Gly Gln Val Val Tyr Val
 35 40 45
 35 Phe Ser Lys Leu Lys Gly Arg Gly Arg Leu Phe Trp Gly Gly Ser Val
 50 55 60
 40 Gln Gly Asp Tyr Tyr Gly Asp Leu Ala Ala Arg Leu Gly Tyr Phe Pro
 65 70 75 80
 Ser Ser Ile Val Arg Glu Asp Gln Thr Leu Lys Pro Gly Lys Val Asp
 85 90 95
 45 Val Lys Thr Asp Lys Trp Asp Phe Tyr Cys Gln
 100 105
 50 <210> 2
 <211> 98
 <212> PRT
 <213> Artificial
 55 <220>
 <223> secuencia generic humana CD-RAP
 60 <220>
 <221> misc_característica
 <222> (2)..(5)
 <223> Xaa puede ser cualquier aminoácido que ocurra naturalmente
 65 <220>

<221> misc_característica
 <222> (7)..(23)
 <223> Xaa puede ser cualquier aminoácido que ocurra naturalmente

5

<220>
 <221> misc_característica
 <222> (25)..(36)
 <223> Xaa puede ser cualquier aminoácido que ocurra naturalmente

10

<220>
 <221> misc_característica
 <222> (38)..(50)
 <223> Xaa puede ser cualquier aminoácido que ocurra naturalmente, en
 donde el número

15

de cualquier aminoácido que ocurra naturalmente puede variar de
 11-13

<220>
 <221> misc_característica
 <222> (52)..(69)
 <223> Xaa puede ser cualquier aminoácido que ocurra naturalmente, en
 donde el número

20

de cualquier aminoácido que ocurra naturalmente puede variar de
 7-18

25

<220>
 <221> misc_característica
 <222> (71)..(74)
 <223> Xaa puede ser cualquier aminoácido que ocurra naturalmente

30

<220>
 <221> misc_característica
 <222> (76)..(96)
 <223> Xaa puede ser cualquier aminoácido que ocurra naturalmente

35

<220>
 <221> misc_característica
 <222> (98)..(98)
 <223> Xaa puede ser cualquier aminoácido que ocurra naturalmente

40

<400> 2

Cys Xaa Xaa Xaa Xaa Cys Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa
 1 5 10 15

45

Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Cys Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa
 20 25 30

50

Xaa Xaa Xaa Xaa Val Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa
 35 40 45

55

Xaa Xaa Trp Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa
 50 55 60

60

Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Phe Xaa Xaa Xaa Xaa Val Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa
 65 70 75 80

Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa
 85 90 95

65

Cys Xaa

- 5
 <210> 3
 <211> 100
 <212> PRT
 <213> Artificial
- 10
 <220>
 <223> secuencia genérica humana CD-RAP
- 15
 <220>
 <221> misc_característica
 <222> (2)..(2)
 <223> Xaa puede ser cualquier aminoácido que ocurra naturalmente
- 20
 <220>
 <221> misc_característica
 <222> (4)..(4)
 <223> Xaa puede ser cualquier aminoácido que ocurra naturalmente
- 25
 <220>
 <221> misc_característica
 <222> (6)..(6)
 <223> Xaa puede ser cualquier aminoácido que ocurra naturalmente
- 30
 <220>
 <221> misc_característica
 <222> (9)..(19)
 <223> Xaa puede ser cualquier aminoácido que ocurra naturalmente
- 35
 <220>
 <221> misc_característica
 <222> (21)..(23)
 <223> Xaa puede ser cualquier aminoácido que ocurra naturalmente
- 40
 <220>
 <221> misc_característica
 <222> (27)..(38)
 <223> Xaa puede ser cualquier aminoácido que ocurra naturalmente
- 45
 <220>
 <221> misc_característica
 <222> (40)..(41)
 <223> Xaa puede ser cualquier aminoácido que ocurra naturalmente
- 50
 <220>
 <221> misc_característica
 <222> (44)..(52)
 <223> Xaa puede ser cualquier aminoácido que ocurra naturalmente, en
 donde el número
- 55
 de cualquier aminoácido que ocurra naturalmente puede variar de
 7-9
- 60
 <220>
 <221> misc_característica
 <222> (54)..(54)
 <223> Xaa puede ser cualquier aminoácido que ocurra naturalmente
- 65
 <220>
 <221> misc_característica
 <222> (57)..(69)

<223> Xaa puede ser cualquier aminoácido que ocurra naturalmente, en
 donde el número
 de cualquier aminoácido que ocurra naturalmente puede variar de
 5-13

5
 <220>
 <221> misc_característica
 <222> (74)..(76)
 <223> Xaa puede ser cualquier aminoácido que ocurra naturalmente

10
 <220>
 <221> misc_característica
 <222> (78)..(95)
 <223> Xaa puede ser cualquier aminoácido que ocurra naturalmente

15
 <220>
 <221> misc_característica
 <222> (98)..(98)
 <223> Xaa puede ser cualquier aminoácido que ocurra naturalmente

20
 <220>
 <221> misc_característica
 <222> (100)..(100)
 <223> Xaa puede ser cualquier aminoácido que ocurra naturalmente

25
 <400> 3

Lys Xaa Cys Xaa Asp Xaa Glu Cys Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa
 1 5 10 15

30
 Xaa Xaa Xaa Asp Xaa Xaa Xaa Pro Asp Cys Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa
 20 25 30

35
 Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Val Xaa Xaa Lys Leu Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa
 35 40 45

40
 Xaa Xaa Xaa Xaa Trp Xaa Gly Ser Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa
 50 55 60

45
 Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Gly Tyr Phe Pro Xaa Xaa Xaa Val Xaa Xaa Xaa
 65 70 75 80

Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Asp
 85 90 95

50
 Phe Xaa Cys Xaa
 100

55
 <210> 4
 <211> 98
 <212> PRT
 <213> Artificial

60
 <220>
 <223> secuencia CD-RAP genérica humana

65
 <220>

<221> misc_característica
 <222> (2)..(2)
 <223> Xaa puede ser cualquier aminoácido que ocurra naturalmente

5 <220>
 <221> misc_característica
 <222> (4)..(4)
 <223> Xaa puede ser cualquier aminoácido que ocurra naturalmente

10 <220>
 <221> misc_característica
 <222> (6)..(7)
 <223> Xaa puede ser cualquier aminoácido que ocurra naturalmente

15 <220>
 <221> misc_característica
 <222> (9)..(16)
 <223> Xaa puede ser cualquier aminoácido que ocurra naturalmente

20 <220>
 <221> misc_característica
 <222> (18)..(19)
 <223> Xaa puede ser cualquier aminoácido que ocurra naturalmente

25 <220>
 <221> misc_característica
 <222> (21)..(23)
 <223> Xaa puede ser cualquier aminoácido que ocurra naturalmente

30 <220>
 <221> misc_característica
 <222> (29)..(33)
 <223> Xaa puede ser cualquier aminoácido que ocurra naturalmente

35 <220>
 <221> misc_característica
 <222> (35)..(35)
 <223> Xaa puede ser cualquier aminoácido que ocurra naturalmente

40 <220>
 <221> misc_característica
 <222> (37)..(41)
 <223> Xaa puede ser cualquier aminoácido que ocurra naturalmente

45 <220>
 <221> misc_característica
 <222> (44)..(50)
 <223> Xaa puede ser cualquier aminoácido que ocurra naturalmente

50 <220>
 <221> misc_característica
 <222> (52)..(52)
 <223> Xaa puede ser cualquier aminoácido que ocurra naturalmente

55 <220>
 <221> misc_característica
 <222> (56)..(67)
 <223> Xaa puede ser cualquier aminoácido que ocurra naturalmente

60 <220>
 <221> misc_característica
 <222> (72)..(93)
 <223> Xaa puede ser cualquier aminoácido que ocurra naturalmente

65 <220>

```

<221> misc_característica
<222> (96)..(96)
<223> Xaa puede ser cualquier aminoácido que ocurra naturalmente

5 <400> 4

Lys Xaa Cys Xaa Asp Xaa Xaa Cys Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa
1 5 10 15

10 Ala Xaa Xaa Asp Xaa Xaa Xaa Pro Asp Cys Arg Phe Xaa Xaa Xaa Xaa
20 25 30

15 Xaa Gly Xaa Val Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Lys Leu Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa
35 40 45

20 Xaa Xaa Trp Xaa Gly Ser Val Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa
50 55 60

25 Xaa Xaa Xaa Gly Tyr Phe Pro Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa
65 70 75 80

Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Asp Phe Xaa
85 90 95

30 Cys Gln

35 <210> 5
<211> 22
<212> ADN
<213> Artificial

40 <220>
<223> secuencia de cebador para el gen MMP-13 humano

<400> 5
45 gggtttcctga tgtgggtgaa ta
22

<210> 6
<211> 19
50 <212> ADN
<213> Artificial

<220>
<223> secuencia de cebador para el gen MMP-13 humano
55 <400> 6
gccatcgtga agtctggta
19

60

```

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO
NIT : 800.176.089-2
- / -

 Industria y Comercio SUPERINTENDENCIA	RECIBO DE CAJA	No. 12 - 0092056
		Bogotá D.C., Septiembre 07 de 2012 - 11:03:29

RECIBIDO DE : HUMBERTO RUBIO & CIA ABOGADOS LTDA					NI 830.000.228
*** Soporte del Pago ***					
TIPO PAGO	BANCO	CUENTA	No. PAGO	FECHA PAGO	VR. PAGO
CONSIGNACION	BANCO DE BOGOTA	062754387	452483485	07/09/2012	7.712.000.00

*** Conceptos Pagados ***				
CANT.	RENTISTICO	CONCEPTO	Vr. UNDITARIO	Vr. CONCEPTO
1	50005-01-01 SOLICITUDES	1 TRAMITES DE SOL. DE PATENTE DE INVENCIÓN	590.000.00	590.000.00
				\$590.000.00
			=====	

SON: **QUINIENTOS NOVENTA MIL PESOS MONEDA CORRIENTE**

Responsable: _____

Recibo de Caja Aplicado al Expediente No. _____

PATENTE DE INVENSION

PATENTE: FORMULACIÓN ESTABLE DE MIA/CD-RAP

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO



No. 12-153702- -00000-0000

Fecha: 2012-09-07 14:13:00 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI
Act. 411 PRESENTACION Folios: 110

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO
NIT : 800.176.089-2
- / -

 Industria y Comercio SUPERINTENDENCIA	RECIBO DE CAJA	No. 12 - 0092057
		Bogotá D.C., Septiembre 07 de 2012 - 11:03:29

RECIBIDO DE : HUMBERTO RUBIO & CIA ABOGADOS LTDA					NI 830.000.228
*** Soporte del Pago ***					
TIPO PAGO	BANCO	CUENTA	No. PAGO	FECHA PAGO	VR PAGO
CONSIGNACION	BANCO DE BOGOTA	062754387	452483485	07/09/2012	7.712.000.00

*** Conceptos Pagados ***				
CANT.	RENTISTICO	CONCEPTO	Vr.UNDITARIO	Vr.CONCEPTO
5	50005-01-01 SOLICITUDES	1607 REIVINDICACION UNITARIA ADICIONAL A LAS 10 INICIALES	30.000.00	150.000.00
				\$150.000.00
=====				

SON: **CIENTO CINCUENTA MIL PESOS MONEDA CORRIENTE**

Responsable: _____
Recibo de Caja Aplicado al Expediente No. _____

EXCSO DE REIVINDICACIONES:

PATENTE: FORMULACIÓN ESTABLE DE MIA/CD-RAP

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO



No. 12-153702- -00000-0000

Fecha: 2012-09-07 14:13:00 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI
Act. 411 PRESENTACION Folios: 110



No. 12-153702- -00000-0000

Fecha: 2012-09-07 14:13:00 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI
Act. 411 PRESENTACION Folios: 110

LISTA DE CHEQUEO
SIÓN A TRÁMITE - NUEVAS CREACIONES

PATENTE DE INVENCION ☐MODELO DE UTILIDAD ☐

Art 33 Decisión 486/00

☐	Indicación que se solicita una patente.
☐	Datos de identificación del solicitante o de la persona que presenta la solicitud
☐	Descripción de la invención
☐	Dibujos de ser estos pertinentes
☐	Comprobante de pago de las tasas establecidas (De ser el caso formato de descuento)
Completa ☐	Incompleta ☐

PATENTE DE INVENCION PCT ☒MODELO DE UTILIDAD PCT ☐

Art.33 Decisión 486/00, Circular Única

☒	Indicación que se solicita una PCT
☒	Copia de la solicitud en español, tal como fue presentada inicialmente (capítulo descriptivo, reivindicatorio, resumen)
☐	Dibujos de ser estos pertinentes
☒	Comprobante de pago de las tasas establecidas (de ser el caso formato de descuento)
Completa ☒	Incompleta ☐

DISEÑO INDUSTRIAL ☐

(Art. 119 Decisión 486/00)

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

ESQUEMA DE TRAZADO ☐

(Art. 92 Decisión 486/00)

☐	Indicación que se solicita un esquema de trazado
☐	Datos de identificación del solicitante o de la persona que presenta la solicitud
☐	Representación gráfica de un esquema de trazado
☐	Comprobante de pago de las tasas establecidas
Completa ☐	Incompleta ☐