

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 392 883**

51 Int. Cl.:
A61K 38/18 (2006.01)
A61P 19/02 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 96 Número de solicitud europea: **07802876 .8**
96 Fecha de presentación: **24.08.2007**
97 Número de publicación de la solicitud: **2054050**
97 Fecha de publicación de la solicitud: **06.05.2009**

54 Título: **Tratamiento de trastornos de cartílagos con FGF-18**

30 Prioridad:
25.08.2006 EP 06119557
28.08.2006 US 840600 P

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
14.12.2012

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
14.12.2012

73 Titular/es:
ARES TRADING S.A. (100.0%)
ZONE INDUSTRIELLE DE L'OURIETTAZ
1170 AUBONNE, CH

72 Inventor/es:
GIMONA, ALBERTO;
LADEL, CHRISTOPH H. y
VOM BAUR, ELMAR

74 Agente/Representante:
DE ELZABURU MÁRQUEZ, Alberto

ES 2 392 883 T3

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

DESCRIPCIÓN

Tratamiento de trastornos de cartílagos con FGF-18.

CAMPO DE LA INVENCION

5 Esta invención pertenece al campo de la medicina y se refiere al tratamiento de trastornos de cartílagos y a la osteoartritis en particular. Más específicamente, se refiere al uso de FGF-18 en regímenes de tratamiento y para la fabricación de un medicamento para el tratamiento de pacientes que tienen un trastorno de cartílago tal como osteoartritis, tal como por ejemplo la osteoartritis de rodilla o la osteoartritis secundaria de cadera. Específicamente se proporciona un esquema de tratamiento preferido que comprende la administración una vez a la semana de un compuesto de FGF-18 (factor de crecimiento de fibroblastos-18) por ciclo de tratamiento.

10 ANTECEDENTES DE LA INVENCION

El FGF18 ha sido identificado como un miembro de la familia FGF que está muy estrechamente relacionado con FGF8 y FGF17. Las actividades asociadas con el FGF18 incluyen la estimulación de las células de líneas mesenquimales, en particular miocitos, osteoblastos y condrocitos cardíacos (Patente de Estados Unidos N° 6.352.971). El FGF18 se une y activa el FGFR4 y la variante IIIc de corte y empalme de FGFR3 y FGFR2.

15 La reestructuración ósea es el proceso dinámico por el cual se mantienen la masa de los tejidos y la arquitectura del esqueleto. El proceso es un equilibrio entre la resorción ósea y la formación ósea, con dos tipos de células que se cree que son las que intervienen principalmente. Estas células son los osteoblastos y los osteoclastos. Los osteoblastos sintetizan y depositan la matriz para que llegue a ser hueso nuevo. Las actividades de los osteoblastos y osteoclastos están reguladas por muchos factores, sistémicos y locales, incluyendo los factores de crecimiento.

20 El cartílago es un tipo de tejido conjuntivo denso. Está compuesto de células llamadas condrocitos, que se dispersan, en una sustancia soporte firme tipo gel, llamada la matriz. El cartílago es avascular (no contiene vasos sanguíneos) y los nutrientes se difunden por la matriz. El cartílago se encuentra en las articulaciones, en la caja torácica, en el oído, en la nariz, en la garganta y entre los discos intervertebrales. Hay tres tipos principales de cartílago: hialino, elástico y fibrocartílago. El fin principal del cartílago es proporcionar un marco en el que la deposición del hueso puede empezar. Otro fin importante del cartílago es proporcionar superficies lisas y protección mecánica para el movimiento de los huesos de la articulación.

25 La sustitución del cartílago dañado, en particular el cartílago articular, a causa de lesiones o por enfermedad es un importante desafío para los médicos, y los tratamientos disponibles se consideran impredecibles y sólo son eficaces durante un tiempo limitado. Virtualmente todos los tratamientos actualmente disponibles para el daño del cartílago se enfocan hacia el alivio del dolor, con escasa o ninguna eficacia sobre la regeneración de los tejidos dañados. Por lo tanto, la mayoría de los pacientes jóvenes o no buscan tratamiento o se les recomienda que pospongan el tratamiento tanto como sea posible. Cuando se requiere tratamiento, el procedimiento estándar es la sustitución total o microfractura de la articulación, un procedimiento que implica la penetración del hueso subcondral para estimular la deposición de fibrocartílago por los condrocitos.

30 Para pacientes con osteoartritis, el tratamiento no quirúrgico consiste en terapia física, modificación del estilo de vida (por ejemplo reducción de la actividad), aparatos ortopédicos, dispositivos de soporte, fármacos orales e inyectables (por ejemplo fármacos antiinflamatorios no esteroideos), y cuidados médicos. Las opciones quirúrgicas son muy específicas para la gravedad de la osteoartritis y pueden proporcionar una reducción de los síntomas que generalmente son de corta duración. La osteotomía tibial o femoral (cortar el hueso para reequilibrar el desgaste de la articulación) puede reducir los síntomas, ayudar a mantener un estilo de vida activo, y retrasar la necesidad del reemplazo total de la articulación. El reemplazo total de la articulación puede proporcionar alivio para los síntomas de osteoartritis avanzada, pero generalmente requiere un cambio en el estilo de vida del paciente y/o en el nivel de actividad.

35 Por lo tanto, sería deseable tener un método para tratar, prevenir o mejorar los síntomas de los trastornos del cartílago que permita la regeneración del tejido dañado. En adición, sería deseable que dicho método fuera tan seguro y eficaz como fuera posible. Además, como los trastornos del cartílago pueden ser enfermedades crónicas, sería deseable que dicho método permita re-tratamientos del paciente.

SUMARIO DE LA INVENCION

40 La presente invención proporciona un uso médico para tratar a un paciente que tiene un trastorno de cartílago que comprende la administración de un compuesto FGF-18 en el que el compuesto FGF-18 se administra al menos dos veces, siendo separadas dichas administraciones por 6, 7, 8, 9 o 10 días. En las realizaciones preferidas de la invención, el trastorno del cartílago a tratar es la osteoartritis, el compuesto FGF-18 es el fragmento FGF-18 designado aquí como FGF-18(170AA) y la posología es de 10 a 30 mcg por inyección intra-articular una vez por semana durante 3 semanas consecutivas (un ciclo de tratamiento). En una realización preferida estos ciclos de tratamiento se pueden repetir después de 4 o 6 meses. Por ejemplo, cuando un ciclo de tratamiento se repite

después de 6 meses, si se empieza un primer ciclo de tratamiento por ejemplo en enero de un año dado, entonces se puede empezar un segundo ciclo de tratamiento en julio de dicho año.

5 Se proporciona además aquí el uso de un compuesto FGF-18 en la fabricación de un medicamento para el tratamiento de un paciente que tiene un trastorno de cartílago en el que el compuesto FGF-18 se administra al menos dos veces, estando separadas dichas administraciones por 6, 7, 8, 9 o 10 días. Se proporciona también aquí el uso de un compuesto FGF-18 para el tratamiento de un paciente que tiene un trastorno de cartílago en el que el compuesto FGF-18 se administra al menos dos veces, estando separadas dichas administraciones por 6, 7, 8, 9 o 10 días.

10 Se proporciona también aquí el uso de un compuesto FGF-18 en la fabricación de un medicamento para el tratamiento de un paciente que tiene un trastorno de cartílago, estando adaptado el medicamento para ser administrado al menos dos veces, siendo separadas dichas administraciones por 6, 7, 8, 9 o 10 días.

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCIÓN

15 La presente invención proporciona modalidades adecuadas de tratamiento, incluyendo esquemas de administración apropiados para el tratamiento de diferentes trastornos del cartílago, tal como en particular la osteoartritis, con compuestos FGF-18, tales como por ejemplo el fragmento proteico FGF-18(170AA). En el contexto de la presente invención se ha encontrado sorprendentemente que los compuestos FGF-18 tienen efectos óptimos de mejoría de la enfermedad o de los síntomas en los trastornos de cartílago cuando se administran según los métodos y usos descritos en esta memoria. Se ha encontrado que programas de administración menos frecuente que la contemplada por la presente invención pueden no ser totalmente eficaces mientras que una administración más frecuente que la contemplada por la presente invención puede producir inflamación y/o otros efectos contraproducentes sobre el cartílago o sobre el entorno de la articulación cuando se utilizan las mismas dosis o dosis comparables a las contempladas por la presente invención.

20 Por consiguiente, en un aspecto de la presente invención se proporciona un método para tratar a un paciente que tiene un trastorno de cartílago que comprende la administración de un compuesto FGF-18 en el que el compuesto FGF-18 se administra al menos dos veces, estando separadas dichas administraciones por 6, 7, 8, 9 o 10 días.

25 En una realización particularmente preferida, dichas administraciones se separan por aproximadamente 6, 7 u 8 días. En una realización preferida se separan por 7 días.

30 En otro aspecto de la presente invención se proporciona el uso de un compuesto FGF-18 en la fabricación de un medicamento para el tratamiento de un paciente que tiene un trastorno de cartílago en el que el compuesto FGF-18 se administra al menos dos veces, siendo separadas dichas administraciones por 6, 7, 8, 9 o 10 días. En una realización particularmente preferida dichas administraciones se separan por 6, 7 u 8 días. En una realización preferida se separan por 7 días.

35 En una realización preferida dichas administraciones se separan 7 días una de otra. Preferiblemente, el compuesto FGF-18 se administra a intervalos regulares una vez por semana.

40 En una realización de la presente invención se proporciona el uso de un compuesto FGF-18 en la fabricación de un medicamento para el tratamiento de un paciente que tiene un trastorno de cartílago siendo adaptado el medicamento para ser administrado al menos dos veces, estando separadas dichas administraciones por 6, 7, 8, 9 o 10 días. En una realización particularmente preferida dichas administraciones se separan por 6, 7 u 8 días. En una realización preferida se separan por 7 días.

45 En una realización preferida dichas administraciones se separan aproximadamente 7 días una de otra. Preferiblemente, el compuesto FGF-18 se administra a intervalos regulares una vez por semana.

50 El compuesto FGF-18 se debe administrar durante al menos 3 semanas consecutivas o al menos 4 semanas consecutivas por ciclo de tratamiento. En una realización preferida un ciclo de tratamiento es un número de semanas consecutivas en el que un compuesto FGF-18 se administra cada semana. En otra realización preferida el compuesto FGF-18 se administra durante 3 semanas consecutivas o 4 semanas consecutivas por ciclo de tratamiento, y dicho tratamiento puede comprender 1, 2, 3, 4, 5 o 6 ciclos de tratamiento por año. En una realización preferida el compuesto FGF-18 se administra durante 3 semanas consecutivas por ciclo de tratamiento. En una realización preferida dicho tratamiento comprende 2 ciclos de tratamiento por año.

55 En una realización preferida el tratamiento comprende la administración intra-articular del compuesto FGF-18. Alternativamente, el tratamiento puede comprender la administración intravenosa del compuesto FGF-18.

En otra realización preferida el tratamiento comprende la administración de una dosis de 1-100 mcg, o preferiblemente 1-60 microgramos (mcg), o preferiblemente 3-50 mcg, o preferiblemente 5-40 mcg, o preferiblemente 10-30 mcg por administración intra-articular individual del compuesto FGF-18. En una realización preferida el tratamiento comprende la administración a una dosis de aproximadamente 3, 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35,

40, 45, 50, 55, 60 mcg por administración intra-articular individual del compuesto FGF-18. Las dosis preferidas incluyen 5, 10, 15, 20, 25 y 30 por administración intra-articular individual del compuesto FGF-18.

5 En otra realización preferida el tratamiento comprende la administración a una dosis de 50-200 mcg/kg, preferiblemente 80-120 mcg/kg por administración intravenosa individual del compuesto FGF-18. En una realización preferida el tratamiento comprende la administración a una dosis de 80, 90, 100, 110 o 120 mcg/kg por administración intravenosa individual del compuesto FGF-18.

10 En una realización preferida el trastorno de cartilago tratado por cualquiera de los métodos de la invención es la osteoartritis, tal como por ejemplo la osteoartritis que se clasifica como grado II o grado III según la OARSI. En un ejemplo preferido, la osteoartritis puede ser osteoartritis de rodilla u osteoartritis de cadera, tal como la osteoartritis secundaria de cadera. Los expertos conocen las clasificaciones de osteoartritis que se utilizan en la técnica. En particular, la clasificación de OARSI es conocida en la técnica. Los expertos pueden referirse a las "Guidelines for the medical management of osteoarthritis" (Marc C. Hochberg, Roy D. Altman, Kenneth D. Brandt, Bruce M. Clark, Paul A. Dieppe, Marie R. Griffin, Roland W. Moskowitz, Thomas J. Schnitzer, *Arthritis & Rheumatism*, Volume 38, Issue 11, 1995. Pages 1535-1546.)

15 Los compuestos FGF-18 preferidos de la invención se seleccionan entre el FGF-18 de tipo natural humano y el FGF-18(170AA).

Compuestos de la invención

20 El FGF-18 innato o natural es una proteína expresada por los condrocitos del cartilago articular. La presente invención se refiere en general al uso de un compuesto de factor de crecimiento de fibroblastos 18 (FGF-18) en el tratamiento de la osteoartritis. Un compuesto FGF-18 de la invención incluye por ejemplo FGF-18 innato o natural, en particular FGF-18 humano, variantes bioactivas del mismo, tales como variantes alélicas bioactivas, y formas truncadas bioactivas de FGF-18. La presente invención se puede referir a cualquier variante o forma modificada de FGF-18 que retenga la bioactividad deseada de FGF-18 como se describe aquí, tal como en particular el aumento en la deposición de cartilago. Las bioactividades de FGF-18 incluyen en particular las descritas en los Ejemplos más adelante en esta memoria, tal como en particular en los modelos de enfermedad *in vivo* descritos aquí.

25 La secuencia nucleotídica del cDNA de FGF-18 humano se describe en la SEQ ID NO. 1, y su secuencia deducida de aminoácidos se describe en la SEQ ID NO. 2. El FGF18 fue originalmente designado como zFGF-5, y está completamente descrito en las patentes de Estados Unidos Números 6.352.971, 5.989.866 y en la Publicación de solicitud de patente de Estados Unidos US2005/0043234, todas las cuales se incorporan aquí como referencia. El análisis del cDNA que codifica un polipéptido FGF18 humano (SEQ ID NO: 1) reveló un marco de lectura abierto que codifica 207 aminoácidos (SEQ ID NO: 2) que comprende un polipéptido maduro de 180 aminoácidos (residuo 28 a residuo 207 de la SEQ ID NO: 2).

30 Se ha encontrado que la secuencia polinucleotídica de FGF-18 de ratón como se muestra en la SEQ ID NO: 3 y la correspondiente secuencia de aminoácidos como se muestra en la SEQ ID NO: 4 tienen un alto grado de homología con la del ortólogo humano. A nivel de los aminoácidos, los polipéptidos de ratón y humanos tienen aproximadamente un 98 % de identidad, con tres cambios de aminoácidos. Los expertos en la técnica reconocerán que las secuencias descritas en la SEQ ID NO: 1 o SEQ ID NO: 3 y en las SEQ ID NO: 2 y SEQ ID NO: 4 representan un único alelo del gen y polipéptido FGF18 humano y de ratón, respectivamente, y que se espera que tengan lugar la variación alélica y la operación alternativa de corte y empalme.

35 Como ya se ha mencionado, el compuesto FGF-18 de la invención incluye por ejemplo el FGF-18 innato o natural, en particular el FGF-18 humano, variantes bioactivas del mismo, tales como variantes bioactivas alélicas, y formas truncadas bioactivas de FGF-18. La presente invención se puede referir a cualquier variante o forma modificada de FGF-18 que retenga la bioactividad de FGF-18 deseada como se describe aquí, tal como en particular el aumento en la deposición de cartilago.

40 En una realización de la presente invención el compuesto FGF-18 es una forma truncada de FGF-18 humano. En una realización particular dicha forma truncada de FGF-18 comprende o consiste en los residuos 28 a 175 de la SEQ ID NO: 2, o un derivado funcional, o una variante o muteína como se definen aquí. En otra realización dicha forma truncada de FGF-18 comprende o consiste en los residuos 28 a 176, 28 a 177, 28 a 178, 28 a 179, 28 a 180, 28 a 181, 28 a 182, 28 a 183, 28 a 184, 28 a 185, 28 a 186, 28 a 187, 28 a 188, 28 a 189, 28 a 190, 28 a 191, 28 a 192, 28 a 193, 28 a 194 o 28 a 195, 28 a 196, 28 a 197, 28 a 198, 28 a 199, 28 a 200, 28 a 201, 28 a 202, 28 a 203, 28 a 204, 28 a 205, 28 a 206 o 28 a 207 de la SEQ ID NO: 2, o un derivado funcional, o una variante o muteína como se definen aquí. Estos polipéptidos, derivado funcional, o variante o muteína pueden comprender un residuo aminoácido de N-terminal adicional, preferiblemente una metionina. De hecho, dependiendo del sistema y condiciones de expresión, los polipéptidos de la invención se pueden expresar en una célula hospedante recombinante con una metionina de inicio.

55 Una realización preferida de la presente invención es una forma truncada de FGF-18, que contiene 170 aminoácidos (AA), de aquí en adelante designada también como "FGF-18(170AA)". La forma natural o que está presente en la naturaleza tiene 207 AA de largo de los cuales los primeros 27 AA son la secuencia señal y los últimos 11 AA están

delecionados en FGF-18(170AA) (como se puede demostrar también para el FGF-18 presente en la naturaleza *in vivo*). El FGF-18(170AA) se puede expresar en *E. coli*, ya que no hay ninguna secuencia señal y la secuencia de AA empieza con una metionina seguida por AA28 y termina con AA196. El peso molecular de FGF-18(170AA) es 19,83 kDa, pI~10. El FGF-18(170AA) se describe además en la SEQ ID NO. 5 aquí más adelante. El FGF-18(170AA) aumenta la proliferación/diferenciación de los condrocitos y la deposición de cartílago llevando a la reparación y reconstrucción de una variedad de tejidos cartilagosos.

Los miembros de la familia FGF se caracterizan por los dominios de unión a la heparina. Se ha identificado un supuesto dominio de unión a la heparina para FGF-18 en la región del residuo aminoácido 148 (Gly) al residuo aminoácido 169 (Gln) de las SEQ ID NO: 2 y SEQ ID NO: 4. Se da por supuesto que la señal mediada por el receptor se inicia después de la unión del ligando FGF complejoado con los proteoglicanos de sulfato de heparina en la superficie celular.

Muchos miembros de la familia FGF se pueden situar en una de las dos familias sobre la base de sus estructuras y funciones. Los aFGF y bFGF consisten en tres exones separados por dos intrones de longitud variable. El FGF-18 consiste en cinco exones, de los cuales los tres primeros corresponden al primer exón de aFGF y bFGF. Todos los miembros conocidos de la familia FGF se someten a corte y empalme para formar polipéptidos individuales.

El análisis del complejo ligando-receptor de FGF-18 ha demostrado que el FGF18 tiene especificidad para FGFR4 y las variantes "IIIc" de corte y empalme de FGFR3 y FGFR2. Los FGFR3-IIIc y FGFR2-IIIc son expresados por los condrocitos del tejido de cartílago, y en particular, se han encontrado ambos receptores dentro del cartílago articular humano. Se han encontrado los FGFR3 y FGFR2 en la placa de cultivo de mamíferos y desempeñan importantes papeles en la formación de hueso endocondral e intramembranoso. El FGFR2 se expresa en primer lugar en la condensación del mesénquima y la expresión de FGFR3 se inicia cuando los condrocitos se diferencian y proliferan. En el desarrollo de los huesos craneales, el FGFR3 se encuentra en la dura mater y en el periostio, mientras que el FGFR2 se expresa en las células osteoprogenitoras en el frente osteógeno que separa las suturas. El FGFR2 se expresa también en el hueso trabecular. Previamente, se ha demostrado que el FGF18 es un agente proliferativo para los condrocitos y osteoblastos, dependiendo tanto del estado de diferenciación de estos tipos de células como del modo de administración. (Véase, las Patentes de Estados Unidos Números 6.352.971 y 5.989.866; Ellsworth *et al.* Osteoarthritis and Cartilage, 10: 308-320, 2002; Shimoaka *et al.*, J. Bio. Chem. 277 (9) 7493-500, 2002).

Preferiblemente, el compuesto FGF-18 de la invención aumenta la deposición de cartílago. Tal aumento se puede medir tanto *in vivo* como *in vitro*. La generación de cartílago hialino, cartílago elástico, y fibrocartílago son valiosas de ambos modos, como un componente terapéutico y como un componente para matrices biológicas. Los compuestos FGF-18, tal como FGF-18(170AA), y las composiciones que contienen los compuestos FGF-18 ("composiciones FGF-18") serán útiles para tratar los defectos del cartílago articular en las articulaciones sinoviales que son debidos a la fibrilación superficial relacionada con la edad, a la degeneración del cartílago debida a la osteoartritis, y a los defectos condrales y osteocondrales focales debidos a lesiones o enfermedad.

Los compuestos y composiciones de FGF-18 pueden ser útiles también para tratar la enfermedad de la articulación causada por la osteocondritis disecante y la enfermedad degenerativa de la articulación. En el campo de la cirugía plástica y reconstructiva, las composiciones de FGF-18 serán útiles para la expansión de cartílago autógeno o alogénico y su transferencia para la reconstrucción de defectos extensos de tejido.

Los compuestos y composiciones de FGF-18 pueden ser útiles también para expandir las células e inducir la producción de cartílago elástico. Las expansiones de células y la inducción de producción de cartílago elástico serán útiles para la generación y reparación de los tejidos del oído y de la nariz. Los compuestos y composiciones de FGF-18 pueden ser útiles también para expandir las poblaciones de condrocitos en cultivo para el trasplante de condrocitos autógenos o alogénicos y administrarlas después con o sin tratamiento concurrente que consiste en la administración de composiciones de FGF-18. En estos procedimientos, por ejemplo, los condrocitos se pueden recoger por artroscopia a partir de un área de la articulación dañada, no lesionada que lleva una carga menor, y se pueden cultivar en presencia de composiciones de FGF18 para aumentar el número de células antes del trasplante. Los cultivos expandidos se mezclarán entonces con composiciones de FGF-18, y se pondrán en el espacio de la articulación o directamente en el defecto. Las composiciones de FGF-18 se pueden usar en combinación con injertos periósticos o pericondriales que contienen células que pueden formar cartílago y/o ayudar a mantener en su sitio los condrocitos trasplantados o sus células precursoras. Las composiciones de FGF-18 se pueden utilizar para reparar el daño del cartílago conjuntamente con el lavado de la articulación, la estimulación de la médula ósea, artroplastia por abrasión, perforación subcondral, o microfractura del hueso subcondral. Adicionalmente, después del crecimiento de cartílago debido a la administración de la composición de FGF-18, puede ser necesario un tratamiento quirúrgico adicional para moldear adecuadamente la superficie del cartílago formado de nuevo.

Un compuesto FGF-18 según la presente invención puede ser también un derivado funcional, una variante o una muteína de una proteína FGF-18 natural.

La expresión "derivados funcionales" como se usa aquí cubre los derivados de FGF-18, y sus variantes o muteínas y proteínas fusionadas, que se pueden preparar a partir de grupos funcionales que aparecen como cadenas laterales

sobre los residuos o sobre los grupos N o C terminales, por medios conocidos en la técnica. Estos derivados funcionales están incluidos en la invención siempre que continúen siendo farmacéuticamente aceptables, esto es que no destruyan la actividad de la proteína, que es sustancialmente similar a, o mejor que, la actividad de FGF-18, y que no confieran propiedades tóxicas a las composiciones que los contienen.

5 Estos derivados pueden incluir, por ejemplo, cadenas laterales de polietilenglicol, las cuales pueden mejorar otras propiedades de la proteína, tales como estabilidad, semivida, biodisponibilidad, tolerancia por el cuerpo humano, o que pueden reducir la inmunogenicidad. Para alcanzar este objetivo, el FGF-18 se puede ligar por ejemplo a polietilenglicol (PEG). La PEGilación se puede llevar a cabo por métodos conocidos, como se describe por ejemplo en el documento WO 92/13095. En particular, se puede preparar PEG-IFN de acuerdo con lo que se indica en el
10 documento WO 99/55377.

Por lo tanto, en una realización preferida, el derivado funcional de FGF-18 comprende al menos un resto unido a uno o más grupos funcionales, que aparece como una o más cadenas laterales sobre los residuos aminoácidos. Una realización en la que el resto es un resto polietilenglicol (PEG) es altamente preferida. De acuerdo con la presente invención, varios restos de PEG pueden estar unidos también al FGF-18.

15 Otros derivados incluyen una proteína FGF-18 modificada, tal como una forma de acción prolongada de FGF-18. En particular, el FGF-18 de acción prolongada se puede seleccionar de FGF-18 pegilado, proteínas de fusión FGF-18-HAS, y proteínas de fusión FGF-18-Fc.

Otros derivados incluyen ésteres alifáticos de los grupos carboxilo, amidas de los grupos carboxilo mediante reacción con amoníaco o con aminas primarias o secundarias, derivados N-acilo de grupos amino libres de los
20 residuos aminoácidos formados con restos acilo (por ejemplo grupos alcanóilo o aroil-carbocíclico) o derivados O-acilo de grupos hidroxilo libres (por ejemplo los de residuos serilo o treonilo) formados con restos acilo.

Las "variantes" o "muteínas", como se usan en el marco de la presente invención, se refieren a análogos de FGF-18, en los que uno o más de los residuos aminoácidos de FGF-18 natural están reemplazados por residuos aminoácidos diferentes, o está deletionados, o uno o más residuos aminoácidos se añaden a la secuencia natural de FGF-18, sin
25 disminuir considerablemente la actividad de los productos resultantes en comparación con el FGF-18 natural. Estas muteínas se preparan por síntesis conocida y/o por técnicas de mutagénesis dirigidas al sitio, o por cualquier otra técnica adecuada conocida para las mismas.

La "variante" o "muteína" de acuerdo con la presente invención incluye proteínas codificadas por un ácido nucleico, tal como DNA o RNA, que se hibridan con el DNA o RNA que codifica el FGF-18 como se describe por ejemplo en la
30 patente de Estados Unidos N° 5.989.866 en condiciones rigurosas. El término "condiciones rigurosas" se refiere a la hibridación y posteriores condiciones de lavado, que los expertos en la técnica convencionalmente denominan como "rigurosas". Véase Ausubel *et al.*, Current Protocols in Molecular Biology, Interscience, N.Y., §§6.3 y 6.4 (1987, 1992). Sin limitación, los ejemplos de condiciones rigurosas incluyen condiciones de lavado a 12-20 °C por debajo de la T_m calculada del híbrido en estudio, por ejemplo, en 2×SSC y SDS al 0,5 % durante 5 minutos, 2×SSC y SDS al 0,1 % durante 15 minutos; 0,1×SSC y SDS al 0,5 % a 37 °C durante 30-60 minutos y después, a 0,1×SSC y SDS al 0,5 % a 68 °C durante 30-60 minutos. Los expertos en la técnica entienden que las condiciones rigurosas dependen también de la longitud de las secuencias de DNA, de las sondas oligonucleotídicas (tales como de 10-40 bases) o de las sondas oligonucleotídicas mixtas. Si se utilizan sondas mixtas, es preferible utilizar cloruro de tetrametilamonio (TMAC) en lugar de SSC (citrato salino de sodio). Véase Ausubel, citado antes.

40 La identidad refleja una relación entre dos o más secuencias de polipéptidos o dos o más secuencias polinucleotídicas, determinada comparando las secuencias. En general, la identidad se refiere a una correspondencia exacta nucleótido a nucleótido o aminoácido a aminoácido de las dos secuencias polinucleotídicas o de las dos secuencias polipeptídicas, respectivamente, sobre toda la longitud de las secuencias a comparar.

Para las secuencias en las que no hay una correspondencia exacta, se puede determinar un "% de identidad". En general, las dos secuencias a comparar se alinean para dar una correlación máxima entre las secuencias. Esto puede incluir insertar "huecos" en una o en ambas secuencias, para mejorar el grado de alineamiento. Se puede determinar el % de identidad sobre toda la longitud de las secuencias a comparar (llamado alineamiento global), que es particularmente adecuado para las secuencias de la misma longitud o de longitud muy similar, o sobre longitudes definidas más cortas, (llamado alineamiento local), que es más adecuado para las secuencias de longitud desigual.
50 Los métodos para comparar la identidad y la homología y/o similitud de dos o más secuencias son bien conocidos en la técnica. Así por ejemplo, los programas disponibles en Wisconsin Sequence Analysis Package, version 9.1 (Devereux J *et al.*, 1984), por ejemplo los programas BESTFIT y GAP, se pueden utilizar para determinar el % de identidad entre dos polinucleótidos y el % de identidad y el % de homología entre dos secuencias polipeptídicas. El programa BESTFIT utiliza el algoritmo de "homología local" de Smith and Waterman (1981) y encuentra la mejor
55 región individual de similitud entre dos secuencias. Otros programas para determinar la identidad y/o la similitud entre secuencias son bien conocidos en la técnica, por ejemplo la familia de programas BLAST (Altschul S F *et al.*, 1990, Altschul S F *et al.*, 1997, accesible a través de la página de NCBI en www.ncbi.nlm.nih.gov) y FASTA (Pearson W R, 1990).

La "variante" o "muteína" de acuerdo con la presente invención incluye proteínas que tienen una secuencia de aminoácidos suficientemente duplicativa de la de FGF-18, tal como para tener una actividad sustancialmente similar al FGF-18.

5 En una realización preferida, cualquiera de tales variantes o muteínas tiene al menos 40 % de identidad u homología con la secuencia de FGF-18. Más preferiblemente, tiene al menos 50 %, al menos 60 %, al menos 70 %, al menos 80 % o, lo más preferiblemente, al menos 90 % de identidad u homología con la misma.

10 Las muteínas de FGF-18, que se pueden usar de acuerdo con la presente invención, o el ácido nucleico que codifica las mismas, incluyen un conjunto finito de secuencias sustancialmente correspondientes como péptidos o polinucleótidos de sustitución que se pueden obtener rutinariamente por los expertos en la técnica, sin experimentación indebida, basándose en las enseñanzas y guías presentadas en esta memoria.

15 Los cambios preferidos para las muteínas de acuerdo con la presente invención son los que se conocen como sustituciones "conservadoras". Las sustituciones conservadoras de aminoácidos de los polipéptidos de FGF-18 pueden incluir aminoácidos sinónimos dentro de un grupo que tiene propiedades fisicoquímicas suficientemente similares en el que la sustitución entre miembros del grupo preservará la función biológica de la molécula (Grantham, 1974). Es claro que las inserciones y deleciones de aminoácidos se pueden realizar también en las secuencias definidas anteriormente sin alterar sus funciones, particularmente si las inserciones o deleciones implican solamente a algunos aminoácidos, por ejemplo, menos de treinta, y preferiblemente menos de diez, y no separan ni desplazan aminoácidos que son críticos para una conformación funcional, por ejemplo, residuos de cisteína. Las proteínas y muteínas producidas por tales deleciones y/o inserciones entran dentro del alcance de la presente invención.

20 Preferiblemente, los grupos aminoácidos sinónimos son los definidos en la Tabla A. Más preferiblemente, los grupos aminoácidos sinónimos son los definidos en la Tabla B; y lo más preferiblemente los grupos aminoácidos sinónimos son los definidos en la Tabla C.

Tabla A

25 Grupos preferidos de aminoácidos sinónimos

| Aminoácido | Grupo sinónimo |
|------------|-----------------------------------|
| Ser | Ser, Thr, Gly, Asn |
| Arg | Arg, Gln, Lys, Glu, His |
| Leu | Ile, Phe, Tyr, Met, Val, Leu |
| Pro | Gly, Ala, Thr, Pro |
| Thr | Pro, Ser, Ala, Gly, His, Gln, Thr |
| Ala | Gly, Thr, Pro, Ala |
| Val | Met, Tyr, Phe, Ile, Leu, Val |
| Gly | Ala, Thr, Pro, Ser, Gly |
| Ile | Met, Tyr, Phe, Val, Leu, Ile |
| Phe | Trp, Met, Tyr, Ile, Val, Leu, Phe |
| Tyr | Trp, Met, Phe, Ile, Val, Leu, Tyr |
| Cys | Ser, Thr, Cys |
| His | Glu, Lys, Gln, Thr, Arg, His |
| Gln | Glu, Lys, Asn, His, Thr, Arg, Gln |
| Asn | Gln, Asp, Ser, Asn |
| Lys | Glu, Gln, His, Arg, Lys |
| Asp | Glu, Asn, Asp |
| Glu | Asp, Lys, Asn, Gln, His, Arg, Glu |
| Met | Phe, Ile, Val, Leu, Met |
| Trp | Trp |

Tabla B

Grupos más preferidos de aminoácidos sinónimos

| Aminoácido | Grupo sinónimo |
|------------|-------------------------|
| Ser | Ser |
| Arg | His, Lys, Arg |
| Leu | Leu, Ile, Phe, Met |
| Pro | Ala, Pro |
| Thr | Thr |
| Ala | Pro, Ala |
| Val | Val, Met, Ile |
| Gly | Gly |
| Ile | Ile, Met, Phe, Val, Leu |

| | |
|-----|-------------------------|
| Phe | Met, Tyr, Ile, Leu, Phe |
| Tyr | Phe, Tyr |
| Cys | Cys, Ser |
| His | His, Gln, Arg |
| Gln | Glu, Gln, His |
| Asn | Asp, Asn |
| Lys | Lys, Arg |
| Asp | Asp, Asn |
| Glu | Glu, Gln |
| Met | Met, Phe, Ile, Val, Leu |
| Trp | Trp |

Tabla C

Los grupos más preferidos de aminoácidos sinónimos

| Aminoácido | Grupo sinónimo |
|------------|----------------|
| Ser | Ser |
| Arg | Arg |
| Leu | Leu, Ile, Met |
| Pro | Pro |
| Thr | Thr |
| Ala | Ala |
| Val | Val |
| Gly | Gly |
| Ile | Ile, Met, Leu |
| Phe | Phe |
| Tyr | Tyr |
| Cys | Cys, Ser |
| His | His |
| Gln | Gln |
| Asn | Asn |
| Lys | Lys |
| Asp | Asp |
| Glu | Glu |
| Met | Met, Ile, Leu |
| Trp | Met |

- 5 Los ejemplos de producción de sustituciones de aminoácidos en proteínas que se pueden utilizar para obtener muteínas de FGF-18 para uso en la presente invención, incluyen cualquier método conocido en etapas, tal como se presentan en las patentes de Estados Unidos Números 4.959.314, 4.588.585 y 4.737.462 para Mark et al; la patente de Estados Unidos N° 5.116.943 para Kothe *et al.*, la patente de Estados Unidos N° 4.965.195 para Namen et al; la patente de Estados Unidos N° 4.879.111 para Chong et al; y la patente de Estados Unidos N° 5.017.691 para Lee et al; y las proteínas sustituidas con lisina presentadas en la patente de Estados Unidos N° 4.904.584 (Shaw et al).

Formulación y administración de un compuesto FGF18

- 15 Los compuestos FGF-18 se pueden formular como una composición farmacéutica, esto es, junto con un vehículo, excipientes o similares, farmacéuticamente aceptables. La definición de "farmacéuticamente aceptable" se indica para englobar cualquier vehículo, que no interfiera con la efectividad de la actividad biológica del ingrediente activo y que no sea tóxico para el hospedante al que se administra. Por ejemplo, para administración parenteral, la proteína o proteínas activas se pueden formular en una forma farmacéutica unitaria para inyección en vehículos tales como solución salina, solución de dextrosa, seroalbúmina y solución de Ringer. Tales formulaciones de compuestos FGF-18 que incluyen adicionalmente al menos un vehículo, excipientes o similares farmacéuticamente aceptables, se denominan también aquí "composiciones FGF-18".
- 20 Los compuestos y composiciones FGF-18 se pueden aplicar por inyección directa al líquido sinovial de la articulación o directamente en el defecto, ya sea solos o complejados con un vehículo adecuado para la liberación extendida de proteínas (tal como por ejemplo excipientes adecuados para formulaciones de liberación lenta, tal como por ejemplo ciclodextrina) o para liberación local restringida (tal como, por ejemplo, administración por medio de esponjas biocompatibles, bio-matrices similares, células encapsuladas o similares).
- 25 Las formulaciones para aplicación intraarticular (IA) cumplirán con la mayor parte de los requerimientos que se aplican también a otras formulaciones inyectables, esto es, necesitan ser estériles y compatibles con las condiciones fisiológicas en el sitio de aplicación (por ejemplo, articulación de la rodilla, líquido sinovial). La esterilidad de las

formulaciones en solución se puede conseguir por medio de autoclavado (si todos los componentes de la formulación son suficientemente resistentes al estrés térmico) o por filtración estéril, mientras que para otras formulaciones, los procesos de fabricación requeridos para asegurar un producto estéril pueden ser más complejos. Por ejemplo, la filtración estéril no es posible para las formulaciones que contienen partículas (suspensiones), formulaciones semi-sólidas o sólidas. Para la compatibilidad de la formulación con las condiciones fisiológicas en el sitio de la inyección, se tienen que tener en cuenta las características del líquido sinovial. Preferiblemente las formulaciones de la invención son por tanto isotónicas. El pH de las formulaciones es próximo al pH del líquido sinovial (esto es, pH 7,4) o ligeramente más bajo, pero preferiblemente no por debajo de pH ~5.5, para permitir la estabilidad óptima del ingrediente activo, mientras que se minimizan los efectos secundarios de los valores de pH no fisiológicos tales como la activación de enzimas proteolíticas, por ejemplo, catepsinas. Los excipientes utilizados para la inyección IA pueden estar también presentes en otras formulaciones inyectables, por ejemplo, para aplicación intramuscular o subcutánea.

En una realización de la presente invención, el modo de administración del compuesto FGF-18 descrito aquí se selecciona del grupo que consiste en: administración intra-auricular, administración peri-auricular, administración intra-nasal, administración peri-nasal, administración endosinusal, administración intra-costal, administración peri-costal, administración intra-torácica, administración peri-torácica, administración epidural, administración peri-vertebral, administración peri-sinovial, administración intra-sinovial, administración endosinusal, administración peri-articular y administración intra-articular. En una realización preferida, el compuesto FGF-18 descrito aquí se administra peri-articularmente (administración alrededor de una articulación) o intraarticularmente (administración dentro de una articulación). En una realización de la presente invención, la administración periarticular o intraarticular se hace alrededor de, o en, una articulación seleccionada entre articulación de la cadera, rodilla, codo, muñeca, tobillo, columna, pies, dedo de la mano, dedo del pie, mano, hombro, costillas, omóplatos, muslos, canillas, talones y a lo largo de los puntos óseos de la columna. En otra realización preferida más, la administración periarticular o intraarticular se realiza alrededor de, o en, la articulación de la cadera o de la rodilla.

Trastornos del cartílago

La presente invención se refiere a métodos para tratar, prevenir o mejorar los síntomas de un trastorno de cartílago en un mamífero. Preferiblemente dicho trastorno de cartílago resulta de daños debidos a lesiones traumáticas o a condropatía. Se entiende que preferiblemente los seres humanos son pacientes a tratar según la presente invención; sin embargo, se entiende que otros mamíferos, incluyendo pero sin limitarse a ellos, perros, caballos y similares se pueden tratar con métodos según la presente invención.

Los ejemplos de trastornos del cartílago que se pueden tratar, prevenir o mejorar por el tratamiento descrito aquí incluyen pero no se limitan a: artritis, osteocondritis, costocondritis (tal como el síndrome de Tietze), osteomielitis, policondritis, policondritis recurrente y osteocondritis disecante.

En una realización de la presente invención, el trastorno de cartílago tratado, prevenido o mejorado es la artritis. Preferiblemente, dicha enfermedad se selecciona del grupo que consiste en: espondilitis anquilosante, hiperostosis esquelética idiopática difusa (DISH), gota, pseudogota, artritis infecciosa, osteoartritis, artritis reumatoide, artritis psoriásica, artritis reactiva, escleroderma, síndrome de Sjögren y enfermedad de Still. En una realización preferida, el trastorno de cartílago tratado, prevenido o mejorado es la artritis reumatoide o la osteoartritis. En una realización particularmente preferida, el trastorno de cartílago tratado, prevenido o mejorado es la osteoartritis.

La artritis, se refiere a un daño en las estructuras articulares (articulaciones) del cuerpo y a procesos inflamatorios relacionados. La artritis, incluyendo osteoartritis, artritis reumatoide, articulaciones artríticas como resultado de una lesión, y similares, son enfermedades inflamatorias comunes que se podrían beneficiar del uso terapéutico de FGF18 según la presente invención.

En una realización de la presente invención, el trastorno de cartílago tratado, prevenido o mejorado es la espondilitis anquilosante. La espondilitis anquilosante (AS) es artritis que implica la columna. Produce dolor y rigidez en la espalda, y también una postura curvada. Esto es resultado de la inflamación e irritación continua de las articulaciones de la columna (vértebras). En los casos graves, la inflamación de las vértebras puede causar eventualmente que se fusionen entre sí llevando a una limitación grave de la movilidad. La inflamación de los tendones y ligamentos que conectan y proporcionan soporte a las articulaciones puede producir dolor y dolor a la palpación en las costillas, omóplatos, caderas, muslos, canillas, talones y a lo largo de los puntos óseos de la columna.

La espondilitis anquilosante es una forma inflamatoria crónica de artritis que afecta las articulaciones de la columna. Las características de contraste de la espondilitis anquilosante es la participación de las articulaciones en la base de la columna donde la columna se une con la pelvis—las articulaciones sacroiliacas (SI).

El curso de la enfermedad es muy variable, y mientras algunos individuos tienen solamente episodios de dolor de espalda transitorio, otros tienen dolor de espalda severo más crónico que lleva a diferentes grados de rigidez de la columna con el tiempo. En casi todos los casos la enfermedad se caracteriza por episodios dolorosos agudos y remisiones (periodos en que el problema se calma).

A lo largo de los años la espondilitis anquilosante ha sido conocida por muchos nombres diferentes incluyendo espalda rígida, espondilitis reumatoide, y espondilitis de Marie-Strumpells. Desde el comienzo de los 70, con el aumento del conocimiento de la enfermedad, casi es universal el uso del término espondilitis anquilosante. La espondilitis anquilosante es un miembro de la familia de enfermedades que atacan la columna.

5 En una realización de la presente invención, el trastorno del cartílago tratado, prevenido o mejorado es la hiperostosis esquelética idiopática difusa. La hiperostosis esquelética idiopática difusa (DISH) se caracteriza por un excesivo crecimiento del hueso a lo largo de los lados de las vértebras de la columna. Implica también inflamación y crecimiento del hueso donde los tendones y ligamentos se unen al hueso, tal como en el codo, rodilla y el talón del pie. Los espolones óseos son comunes entre las personas con DISH.

10 La DISH (llamada a veces enfermedad de Forestier) se considera una forma de artritis degenerativa y se caracteriza por un excesivo crecimiento del hueso a lo largo de los lados de las vértebras de la columna. Está asociada también con la inflamación y calcificación (crecimiento óseo) en otras áreas del cuerpo donde los tendones y ligamentos se unen al hueso, tal como tal como en el codo, rodilla y el talón del pie. Estos pueden llevar a espolones de hueso. Los espolones en los talones, por ejemplo, son comunes entre las personas con DISH.

15 En una realización de la presente invención, el trastorno del cartílago tratado, prevenido o mejorado es la gota. La gota es un tipo de artritis en la que el ácido úrico, un producto de desecho que aparece naturalmente dentro del cuerpo, alcanza niveles superiores a los normales. En lugar de ser arrastrado por los riñones y a través de la orina, como normalmente ocurre, forma cristales y depósitos en las articulaciones. Estos depósitos hacen surgir la inflamación de las articulaciones, causando dolor, hinchazón, enrojecimiento y dolor a la palpación del área. Muy típicamente la articulación afectada es la del dedo gordo del pie, pero la gota puede afectar también al tobillo, rodilla, pie, mano, muñeca y codo. Los cristales de ácido úrico pueden formar también depósitos en otras zonas tales como debajo de la piel o en otros tejidos blandos, y en los riñones y el tracto urinario.

20 La gota afecta típicamente a la articulación en la base del dedo gordo del pie. En casi la mitad de todos los ataques iniciales, esta es la primera articulación afectada. Casi cualquier otra articulación puede ser afectada, pero las articulaciones de los miembros inferiores son más comúnmente afectadas que las de los miembros superiores.

25 La mayoría de los ataques iniciales de gota implican solo una articulación, y, con tratamiento, se calman en tres a diez días. Más del 50 % de las personas que han tenido un ataque agudo de gota tendrán una recurrencia antes de un año. Con el tiempo los ataques pueden llegar a ser más frecuentes, de mayor duración y a menudo afectan a más articulaciones.

30 Para algunas personas los ataques persisten, y la enfermedad se hace crónica. Los cristales de ácido úrico depositados dentro de la articulación y en los tejidos blandos de alrededor llevan a cambios destructivos en la articulación y causan una inflamación persistente.

35 En una realización de la presente invención, el trastorno del cartílago tratado, prevenido o mejorado es la pseudogota. La pseudogota es un tipo de artritis que es causada por la acumulación de calcio en el cuerpo. La pseudogota resulta de una acumulación de cristales de calcio (pirofosfato de calcio dihidrato) en una articulación. El calcio forma cristales que se depositan en las articulaciones entre los huesos. Esto causa hinchazón y dolor en la zona. El calcio se deposita y la inflamación crónica puede hacer que partes de la estructura de la articulación se debiliten y se rompan.

40 Con la pseudogota el cartílago puede empezar a romperse y a tener agujeros y causar más dolor e hinchamiento en la articulación. Con el tiempo el cartílago se puede desgastar completamente, y los huesos se friccionan entre sí.

45 Gran parte del dolor de la pseudogota es el resultado de que los músculos y los otros tejidos que ayudan a las articulaciones a moverse (tales como tendones y ligamentos) son forzados a trabajar de una manera para la que no han sido diseñados, como resultado del daño del cartílago. El propio cartílago no tiene células nerviosas, y por tanto no puede sentir dolor, pero los músculos, tendones, ligamentos y huesos sí las tienen. Después de muchos años de erosión del cartílago, los huesos pueden realmente friccionarse entre sí. Este rechinar de hueso contra hueso añade más dolor. Los huesos también se pueden hacer más espesos y formar crecimientos, llamados espolones u osteofitos, que se friccionan entre sí.

Como la enfermedad de la gota, la pseudogota puede venir como ataques repentinos, recurrentes de dolor e hinchazón en una única articulación.

50 En una realización de la presente invención, el trastorno del cartílago tratado, prevenido o mejorado es la artritis infecciosa. La artritis infecciosa causa dolor e hinchazón en las articulaciones. La inflamación es causada por un germen. El germen puede ser una bacteria, un virus, o un hongo. Normalmente sólo hay implicada una articulación, aunque a veces pueden llegar a estar infectadas dos o tres articulaciones. Usualmente no dura mucho tiempo si se trata pronto.

55 En su mayor parte, la artritis infecciosa afecta a las articulaciones grandes (hombros, caderas, rodillas), pero también se pueden ver implicadas articulaciones más pequeñas (dedos, tobillos).

En una realización preferida de la presente invención, el trastorno del cartílago tratado, prevenido o mejorado es la osteoartritis. La osteoartritis es la forma más común de artritis. Puede ser causada por la rotura de cartílago. Trozos de cartílago se pueden romper y causar dolor e hinchazón en la articulación entre los huesos. Con el tiempo el cartílago se puede desgastar completamente, y los huesos se friccionan entre sí.

- 5 La osteoartritis puede afectar a cualquier articulación pero usualmente afecta a las manos y a las articulaciones que soportan peso tales como caderas, rodillas, pies, y columna.

10 La enfermedad de osteoartritis (OA) es una enfermedad compleja, multi-factorial, progresiva, que no es de naturaleza inflamatoria y que se caracteriza por una degradación general del cartílago articular en las articulaciones, relacionada con la edad. La OA se caracteriza también por la activación de los condrocitos que lleva a la proliferación y apoptosis celular, a la expresión de proteasa y a la producción anormal de matriz, fallo de la reparación del cartílago que lleva a la pérdida de matriz extracelular, a la calcificación de la matriz y a la formación de osteofitos. La degradación del cartílago y de las estructuras extracelulares de la matriz lleva a un aumento de la fricción entre los huesos y nervios de las articulaciones afectadas. La OA causa niveles variables de dolor y debilitación progresiva en los afectados con la enfermedad. Las terapias actuales para la OA son paliativas o quirúrgicas.

15 En las articulaciones sanas el cartílago actúa como un absorbente del impacto cuando se pone peso sobre la articulación. La superficie resbaladiza del cartílago permite que los huesos se muevan suavemente. Cuando una articulación desarrolla osteoartritis el cartílago se hace gradualmente áspero y delgado, y el hueso se espesa por debajo.

- 20 Aunque usualmente no hay hinchazón en la primera etapa de la enfermedad, cuando la artritis progresa puede haber inflamación. Se pueden romper trozos de cartílago y pueden flotar circularmente en el interior de la articulación. Esto perturba a otros tejidos blandos dentro de la articulación y puede causar dolor e hinchazón entre los huesos.

25 Con el tiempo cuando el cartílago se desgasta, los huesos pueden formar protuberancias en sus extremos. Estas protuberancias se llaman espolones. Así que, el cartílago se puede desgastar completamente, y los huesos se ponen en contacto directamente uno con otro.

La OA puede llevar a otros problemas tales como: los músculos que mantienen la articulación en su sitio se debilitan porque no están siendo usados, con el tiempo la articulación pierde su forma y no trabaja en absoluto.

- 30 La OA comúnmente afecta las articulaciones que soportan peso tales como caderas, rodillas, pies y columna. Sin embargo, las articulaciones que no soportan peso tales como las articulaciones de los dedos y la articulación de la base del dedo pulgar también se pueden ver afectadas. Usualmente no afecta a otras articulaciones, excepto cuando han sido lesionadas o sometidas a un estrés inusual

35 En una realización de la presente invención, el trastorno del cartílago tratado, prevenido o mejorado es la artritis reumatoide. La artritis reumatoide (RA) es una enfermedad inflamatoria autoinmune sistémica crónica que implica principalmente la membrana sinovial de múltiples articulaciones con lesión resultante para el cartílago articular. La patogénesis es dependiente de los linfocitos T y está asociada con la producción de factores reumatoides, auto-anticuerpos dirigidos frente a la propia IgG, con la formación resultante de complejos inmunes que alcanzan altos niveles de fluido y sangre en la articulación. Estos complejos de la articulación pueden inducir el notable infiltrado de linfocitos y monocitos en el sinovio y subsiguientes cambios sinoviales marcados; el espacio/fluido de la articulación es infiltrado por células similares con la adición de numerosos neutrófilos. Los tejidos afectados son principalmente las articulaciones, a menudo de forma simétrica. Las células inflamatorias liberan enzimas que pueden digerir el hueso y el cartílago. Como resultado de la artritis reumatoide, el revestimiento de la articulación inflamada, el sinovio, puede invadir y dañar el hueso y el cartílago llevando al deterioro de la articulación y a un severo dolor entre otros efectos fisiológicos. La articulación implicada puede perder su forma y alineamiento, dando como resultado dolor y pérdida de movimiento. Por lo tanto la RA puede llevar a una incapacidad severa y a un aumento de la mortalidad.

45 El daño de la articulación puede ocurrir incluso en casos en que el dolor no es severo. Ocurre incluso en las etapas tempranas de la enfermedad. Para muchas personas con RA, el daño se ha observado hasta con rayos X en las manos y pies antes de dos años del comienzo de la enfermedad. Pero puede ser demasiado tarde para tratar cuando los rayos X descubren el problema.

50 Un daño severo puede llevar a un deformidad permanente de la articulación y a la incapacitación. El dolor y la hinchazón pueden causar dificultades para caminar

55 Se producen una variedad de citocinas localmente en las articulaciones reumatoides. Numerosos estudios han demostrado que la IL-1 y el TNF-alfa, dos citocinas pro-inflamatorias prototípicas, desempeñan un importante papel en los mecanismos implicados en la inflamación sinovial y en la destrucción progresiva de la articulación. De hecho, la administración de inhibidores de TNF-alfa y IL-1 en los pacientes con RA ha llevado a una notable mejora de los signos clínicos y biológicos de inflamación y a una reducción de los signos radiológicos de erosión del hueso y

- destrucción del cartílago. Sin embargo, a pesar de estos resultados alentadores, un importante porcentaje de pacientes no responden a estos agentes, lo que da a entender que también están implicados otros mediadores en la patofisiología de la artritis. Otro modo importante para distinguir la RA de otras formas de artritis es por el modelo de implicación de la articulación. Por ejemplo, la RA afecta la muñeca y muchas de las articulaciones de la mano pero usualmente no afecta a las articulaciones que son más distales.
- 5
- En la RA, las articulaciones tienden a estar implicadas en un modelo simétrico. Esto es, si se inflaman los nudillos de la mano derecha, probablemente los nudillos de la mano izquierda se inflamarán también. Otras articulaciones afectadas comúnmente por la RA incluyen los codos, hombros, cuello, mandíbula, pies, tobillos, rodillas, y caderas. Aparte del cuello, la columna no está directamente afectada por la RA.
- 10
- En una realización de la presente invención, el trastorno del cartílago tratado, prevenido o mejorado es la artritis psoriásica. La artritis psoriásica es una enfermedad que causa hinchazón y dolor en las articulaciones y alrededor de ellas. Causa también una erupción escamosa en la piel. Puede afectar a muchas articulaciones incluyendo las articulaciones de los dedos, muñecas, dedos gordos del pie, rodillas, tobillos, codos y hombros, la columna y las articulaciones de la parte inferior de la espalda (llamadas articulaciones sacroiliacas).
- 15
- La artritis psoriásica afecta también a los tejidos que rodean las articulaciones incluyendo tendones y ligamentos. Puede causar la hinchazón de un dedo completo llamado dedo “salchicha”. Hay también inflamación de la piel, particularmente en los codos, rodillas y cuero cabelludo. La artritis psoriásica está ligada a la psoriasis, un trastorno que hace que zonas de la piel se inflamen y se cubran de costras plateadas o grises.
- 20
- En una realización de la presente invención, el trastorno del cartílago tratado, prevenido o mejorado es la artritis reactiva. La artritis reactiva se refiere a dolor, rigidez, enrojecimiento o hinchazón en una articulación que resulta de una infección previa. Aparece lo más frecuentemente en las articulaciones de las extremidades inferiores (rodillas, tobillos, dedos gordos de los pies), pero también puede aparecer en las extremidades superiores. Los problemas pueden estar solamente en las articulaciones o implicar otros sistemas corporales tales como los ojos, piel, músculos o tendones. Cuando afecta a otras zonas además de las articulaciones, la artritis reactiva se llama entonces síndrome de Reiter.
- 25
- En una realización de la presente invención, el trastorno del cartílago tratado, prevenido o mejorado es la escleroderma. La escleroderma es una enfermedad en la que la piel se hace gruesa y dura. Hay dos tipos principales de escleroderma. Un tipo es la escleroderma localizada, que afecta principalmente a la piel. Puede implicar a los músculos y a las articulaciones. El otro tipo, escleroderma generalizada, afecta a la piel así como a los órganos internos, tales como el corazón, los pulmones y los riñones.
- 30
- El comportamiento más característico de la escleroderma es la construcción de tejido fibroso tipo cicatriz dura en la piel. Cambios menos visibles incluyen el daño a las células que recubren las paredes de los vasos sanguíneos pequeños. Esto puede dañar a su vez a órganos mayores.
- 35
- En una realización de la presente invención, el trastorno del cartílago tratado, prevenido o mejorado es el síndrome de Sjögren. El síndrome de Sjögren es un trastorno crónico que causa daños a las glándulas salivares produciendo una boca seca, y a las glándulas lacrimales, produciendo ojos secos. Puede afectar también a otras partes del cuerpo incluyendo articulaciones, músculos y nervios, órganos tales como los pulmones, los riñones, el hígado, el páncreas, el estómago y el cerebro, o glándulas tales como la glándula tiroidea. El síndrome de Sjögren puede causar la destrucción completa de cualquiera de estas zonas. Puesto que el síndrome de Sjögren puede afectar al hígado y al páncreas, existe una gran probabilidad de desarrollar cáncer del tejido linfático. Sin embargo, este es un resultado inusual y raro.
- 40
- El síndrome de Sjögren se puede presentar de dos modos. Es síndrome de Sjögren “secundario” cuando aparece en personas que tienen una afección reumática o una enfermedad del tejido conjuntivo tal como lupus, escleroderma o polimiositis. Se denomina síndrome de Sjögren “primario” cuando los ojos y la boca secos no se asocian con una afección reumática.
- 45
- En una realización de la presente invención, el trastorno del cartílago tratado, prevenido o mejorado es la enfermedad de Still. La enfermedad de Still es una forma de artritis caracterizada por altos picos de fiebre, sarpullidos de color salmón e inflamación de las articulaciones. La enfermedad es más común entre los niños, para los cuales comúnmente se denomina artritis idiopática sistémica juvenil. La enfermedad de Still puede aparecer también entre adultos, aunque con mucha menos frecuencia que en los niños. En este caso se denomina enfermedad de Still de aparición en adultos o AOSD.
- 50
- Como se ha descrito aquí anteriormente, los trastornos del cartílago que se pueden tratar, prevenir o mejorar por el tratamiento descrito aquí incluyen: osteocondritis disecante, costocondritis (tal como síndrome de Tietze), osteomielitis, y policondritis recurrente.
- 55
- En una realización de la presente invención, el trastorno del cartílago tratado, prevenido o mejorado es la osteocondritis disecante. Osteocondritis disecante (OCD) es un término para la fractura osteocondral. Un fragmento osteocondral puede estar presente *in situ*, desprendido de forma incompleta, o desprendido de forma completa. La

OCD es una forma de osteocondrosis limitada a las epífisis articulares. Las epífisis articulares fallan como resultado de la compresión. Tanto los traumatismos como la isquemia están probablemente implicados en la patología. El traumatismo es muy probablemente la lesión primaria, con la isquemia como lesión secundaria.

5 El traumatismo puede ser causado por traumatismo directo, tal como fractura por impacto, o microtraumatismos repetitivos, tal como un estrés de compresión normal excesivo.

La articulación de la rodilla es el sitio más comúnmente implicado. Sin embargo, también se pueden ver afectadas la articulación del codo, la articulación del tobillo, el hueso navicular tarsal, la articulación de cadera, la articulación del hombro, la articulación glenoidea y la articulación de la muñeca.

10 La OCD tiende a afectar a pacientes jóvenes. En la OCD del codo, la edad del paciente es de 23 años de media y varía de 4-47 años. En el tobillo, la edad del paciente es de 20 años de media y varía de 8-50 años. En la cadera, la edad del paciente es de 24 años de media y varía de 14-39 años.

Los pacientes usualmente declaran dolor en los extremos del intervalo de movimiento. A menudo está presente edema periarticular con ligero calor al tacto. Cuando está implicada una extremidad inferior, los pacientes cojean a menudo. Usualmente mejoran los síntomas con la inmovilización protegida de la articulación.

15 En una realización de la presente invención, el trastorno del cartílago tratado, prevenido o mejorado es la costocondritis. La costocondritis es una inflamación de las uniones en las que las costillas superiores se unen con el cartílago que las sujeta al hueso del tórax o esternón. Normalmente la causa es desconocida. Cuando el dolor de la costocondritis va acompañado de hinchazón se denomina síndrome de Tietze.

20 En una realización de la presente invención, el trastorno del cartílago tratado, prevenido o mejorado es la osteomielitis. La osteomielitis es un proceso inflamatorio agudo o crónico del hueso y de sus estructuras secundario a una infección con organismos piógenos.

La infección asociada con la osteomielitis puede estar localizada o puede estar dispersa a través del periostio, corteza, médula, y tejido esponjoso. El patógeno bacteriano varía sobre la base de la edad del paciente y del mecanismo de infección.

25 La osteomielitis hematógena aguda es una infección causada por la siembra bacteriana desde la sangre. La osteomielitis hematógena aguda se caracteriza por una infección aguda del hueso causada por la siembra de las bacterias dentro del hueso a partir de una fuente remota. Esta afección se presenta principalmente en niños. El sitio más común es la metáfisis de crecimiento rápido y altamente vascular de los huesos en crecimiento. La aparente ralentización o sedimentación del flujo sanguíneo cuando los vasos presentan ángulos agudos en la metáfisis distal predispone a los vasos a la trombosis y al propio hueso a la necrosis localizada y la siembra bacteriana. La osteomielitis hematógena aguda, a pesar de su nombre, puede tener un desarrollo clínico lento y un comienzo insidioso.

30 La osteomielitis por inoculación directa o contigua es causada por contacto directo del tejido y las bacterias durante el traumatismo o la cirugía. La osteomielitis por inoculación directa (foco contiguo) es una infección en el hueso secundaria a la inoculación de organismos a partir de un traumatismo directo, a la dispersión desde un foco contiguo de infección, o a la sepsis después de un procedimiento quirúrgico. Las manifestaciones clínicas de la osteomielitis por inoculación directa están más localizadas que las de la osteomielitis hematógena y tienden a implicar múltiples organismos.

35 Las categorías adicionales incluyen osteomielitis crónica y osteomielitis secundaria a una enfermedad vascular periférica. La osteomielitis crónica persiste o vuelve, sin tener en cuenta su causa y/o el mecanismo inicial y a pesar de una intervención agresiva. Aunque se incluye como una etiología, la enfermedad vascular periférica es realmente un factor de predisposición más que una verdadera causa de infección.

40 Las enfermedades que se sabe que predisponen a los pacientes a la osteomielitis incluyen diabetes mellitus, anemia drepanocítica, síndrome de inmunodeficiencia adquirida (SIDA), abuso de fármacos IV, alcoholismo, uso crónico de esteroides, inmunodepresión, y enfermedad crónica de las articulaciones. En adición la presencia de un dispositivo ortopédico protésico es un factor de riesgo independiente como lo es cualquier cirugía ortopédica reciente o fractura abierta.

45 En una realización de la presente invención, el trastorno del cartílago tratado, prevenido o mejorado es la policondritis recurrente. La policondritis recurrente (RP) es una afección inflamatoria episódica poco común y grave que implica estructuras cartilaginosas, predominantemente las del oído, nariz y árbol laringotraqueobronquial. Otras estructuras afectadas pueden incluir el ojo, el sistema cardiovascular, las articulaciones periféricas, el oído medio, y el oído interno. La etiología de esta enfermedad es desconocida; sin embargo, la patogénesis es muy probablemente de naturaleza autoinmune. Los signos de una etiología autoinmune incluyen su asociación clínica con otros trastornos autoinmunes, su asociación con el haplotipo HLA-DR4, los hallazgos de patología de infiltración de células CD4 T y los complejos antígeno-anticuerpo en el cartílago afectado, las respuestas celulares y humorales

frente al colágeno tipo II y otros antígenos de colágeno, y la observación de que los regímenes inmunodepresores deprimen muy a menudo la enfermedad.

5 En una realización de la presente invención, el trastorno del cartílago tratado, prevenido o mejorado es el daño al cartílago resultante de un traumatismo. Las lesiones del cartílago pueden ocurrir como resultado de destrucción mecánica traumática. Un golpe directo u otro trauma pueden lesionar el cartílago. El cartílago no tiene suministro directo de sangre, por lo que tiene poca capacidad para repararse a sí mismo. Los métodos de la presente invención mejoran la reparación del cartílago. Por lo tanto en una realización de la presente invención, el daño al cartílago que es debido a un traumatismo es el resultado de un accidente o de la cirugía. En una realización particular de la presente invención, el daño al cartílago que es debido a un traumatismo es el resultado de la cirugía, en particular la cirugía ortopédica o la cirugía plástica. También se considera en la presente invención el tratamiento de las lesiones relacionadas con el deporte o el desgaste de los tejidos de la articulación relacionado con el deporte.

10 En una realización de la presente invención, el trastorno del cartílago tratado, prevenido o mejorado es un trastorno de aspecto inestético. En dicha realización, el método y el uso de la presente invención se pueden utilizar en asociación con la cirugía plástica.

15 Habiendo descrito ahora completamente esta invención, los expertos en la técnica apreciarán que se puede llevar a cabo la misma con un amplio intervalo de parámetros, concentraciones y condiciones equivalentes sin separarse del espíritu y alcance de la invención y sin una experimentación indebida.

20 Aunque esta invención ha sido descrita en conexión con realizaciones específicas de la misma, se entenderá que es capaz de modificaciones adicionales. Esta solicitud pretende cubrir todas las variaciones, usos o adaptaciones de la invención que siguen, en general, los principios de la invención e incluyendo aquellas separaciones de la presente descripción que vienen de la práctica conocida o habitual dentro del arte al que pertenece la invención y que pueden ser aplicadas a las características esenciales indicadas aquí anteriormente, como sigue en el alcance de las reivindicaciones adjuntas.

25 La referencia a etapas de métodos conocidos, etapas de métodos convencionales, métodos conocidos o métodos convencionales no es en modo alguno una admisión de que algún aspecto, descripción o realización de la presente invención está descrito, enseñado o sugerido en la técnica relevante

30 La descripción anterior de las realizaciones específicas revelará así completamente la naturaleza general de la invención, que otros, aplicando el conocimiento de la experiencia en la técnica (incluyendo los contenidos de las referencias citadas aquí), pueden modificar fácilmente y/o adaptar para diferentes aplicaciones tales realizaciones específicas, sin experimentación indebida, sin separarse del concepto general de la presente invención. Por lo tanto, tales adaptaciones y modificaciones pretenden estar dentro del significado e intervalo de equivalentes de las realizaciones descritas, basándose en las enseñanzas y guías presentadas aquí. Se debe entender que la fraseología o terminología de esta memoria tiene el propósito de descripción y no de limitación, de tal modo que la terminología o fraseología de la presente memoria descriptiva debe ser interpretada por los expertos a la luz de las enseñanzas y guías presentadas aquí, en combinación con el conocimiento de los expertos.

EJEMPLO 1: Modelos de enfermedad en animales y farmacología extendida

40 Se ensayó *in vivo*, FGF-18(170AA) en diferentes modelos de enfermedad de OA y cartílago dañado, con significativa eficacia terapéutica utilizando una administración intra-articular (i.a.). En conjunto, fue demostrable una dosis terapéuticamente eficaz de 3-40 µg i.a. por animal/semana en diferentes especies (rata, perro). Los resultados de los modelos animales mencionados de la enfermedad (OA así como defectos de cartílago) se resumen a continuación.

Tabla 1: Resumen de estudios de farmacología con FGF-18(170AA)

| Animal | Modelo de enfermedad | Dosis ($\mu\text{g}/\text{inyección}$) | Vía/Administración | Resultados |
|--------|--|---|---|---|
| Rata | OA inducida por lesiones | 0,1, 1, 5 (formulado en hialuronano) | 2 veces por semana; inyecciones i.a. durante 3 semanas | <ul style="list-style-type: none"> Reducción de la degeneración del cartílago Reducción de la profundidad de las lesiones del cartílago de una manera dosis-dependiente. Se alcanzó significancia estadística en el grupo de 5 μg |
| | Modelo de OA con desgarro de menisco (I) | 0,1, 1 o 10 (formulado en hialuronano) | 2 veces por semana; inyecciones i.a. durante 3 semanas | <ul style="list-style-type: none"> Reducción de puntuaciones de la lesión del cartílago en la meseta tibial medial (hasta 84 % de disminución a 1 μg i.a.) Aumento del espesor del cartílago tibial El cartílago nuevo generado integrado con el cartílago preexistente Aumento del tamaño de los condrofitos Aumento de resorción/reestructuración ósea (hasta 42 % de disminución del daño de la lesión a 1 μg). |
| | Modelo de OA con desgarro de menisco (II) ^a | 0,3, 1, 3 o 10 (formulado en solución salina) | Inyección i.a. (i) dosis única, (ii) una vez por semana (1/3 de la dosis total por inyección) durante 3 semanas o (iii) 3 veces por semana (1/9 de la dosis total por inyección). Durante periodos de tratamiento de 3 semanas, también hubo 3 semanas de seguimiento sin tratamiento | <ul style="list-style-type: none"> Aumento de la estimulación perióstica Mejores criterios histopatológicos Aumento de las puntuaciones de reparación de la morfología gruesa Respuesta a la dosis conseguida en la terapia de una vez por semana ED₅₀ aprox. 1,5 $\mu\text{g}/\text{articulación}$ una vez por semana, efectos significativos a 3 $\mu\text{g}/\text{articulación}$ una vez por semana. |

Tabla 2: Resumen de estudios de farmacología con FGF-18(170AA) (continuación)

| Animal | Modelo de enfermedad | Dosis ($\mu\text{g}/\text{inyección}$) | Vía/Administración | Resultados |
|--------|---|--|---|--|
| Perro | OA con menisectomía ^a | 3, 10, 30 (formulado en solución salina) | Inyección i.a. (i) dosis única, (ii) una vez por semana (1/3 de la dosis total por inyección) durante 3 semanas o (iii) 3 veces por semana durante 3 semanas (1/9 de la dosis total por inyección). | <ul style="list-style-type: none"> Mejores criterios histopatológicos Aumento de las puntuaciones de reparación de la morfología gruesa No se obtuvo una respuesta clara a la dosis debido al bajo número de animales implicados, eficacia demostrable en todas las dosis aplicadas, con efecto más pronunciado a 10 y 30 μg por perro i.a. |
| | Ligamento cruzado anterior (ACL) ^a | 0, 3, 10, 30 | Una vez por semana i.a. | Véase el ejemplo 1.3 |

^a Se expone en más detalle a continuación

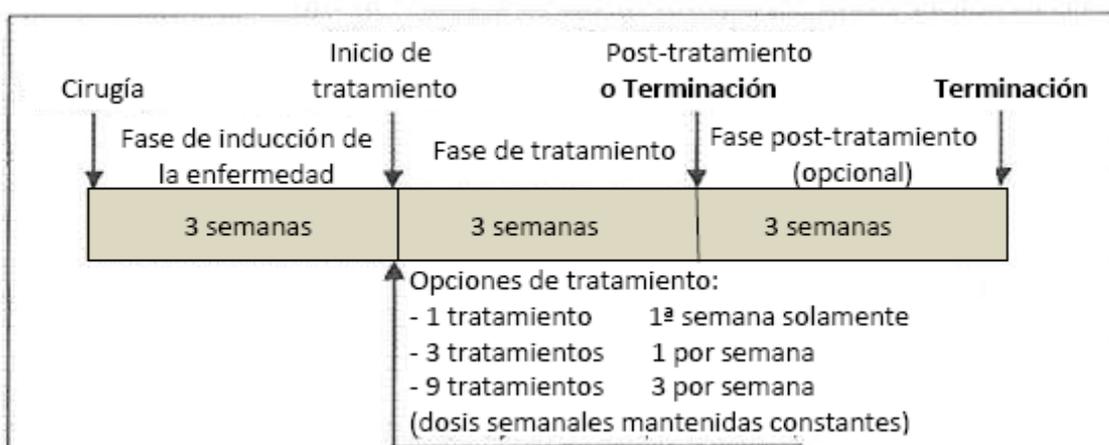
5 EJEMPLO 1.1: Modelo de OA con desgarro de menisco en rata

Método

Se sometieron a cirugía ratas Lewis machos (5-10/grupo) para inducir un desgarro meniscal medial en la articulación de la rodilla derecha. Se inició la administración por vía i.a. 19-21 días después de la cirugía a dosis de 0,3, 1, 3 o 10 μg (formulado en solución salina) para determinar los efectos farmacodinámicos relacionados con el régimen de administración. Estas dosis totales se administraron de una de estas formas, como (i) dosis única, (ii) una vez a la

semana ($\frac{1}{3}$ de la dosis total por inyección) durante 3 semanas, o (iii) tres veces a la semana durante 3 semanas ($\frac{1}{9}$ de la dosis total por inyección).

- 5 Al concluir el tratamiento o después de 3 semanas post-tratamiento, se recogieron las rodillas derechas para evaluación histopatológica de los efectos potenciales. La evaluación de las lesiones se realizó en 3 zonas diferentes: se tuvieron en cuenta las diferencias regionales a lo largo de la meseta tibial medial dividiendo cada sección en 3 zonas (1-externa, 2-media, 3-interna). En el modelo de OA quirúrgica, los tercios externo (z1) y medio (z2) son usualmente los más gravemente afectados, y en el tercio interno (z3) se presentan cambios más suaves.



Esquema de programa de tratamiento:

10 Diseño experimental

Los animales (5-10/grupo), agrupados 2-3/jaula, se anestesian con isoflurano y se prepara el área de la rodilla derecha para cirugía. Se hace una incisión en la piel sobre el aspecto medial de la rodilla y se expone el ligamento colateral medial por disección cerrada, y después se secciona transversalmente. El menisco medial se corta en todo su espesor para simular un desgarro completo. Se cierran la piel y la hipodermis con una sutura Vicryl 4-0 utilizando un patrón subcuticular. Se inicia la administración por vía intra-articular 19-21 días después de la cirugía y se para después de una dosis única o se continúa durante 3 semanas con inyecciones intra-articulares una vez por semana o 3 veces por semana. Se termina entonces con las ratas (grupos 1-16) o se deja que se recuperen durante 3 semanas adicionales antes de la terminación (grupos 17-32). Cuatro horas antes de la necropsia, todas las ratas recibieron 50 mg/kg de BRDU (bromodesoxiuridina) para marcar las células que proliferan activamente. Se recoge la sangre para obtener suero justo antes de la necropsia y se realiza el lavado sinovial en la rodilla derecha. En la necropsia, la articulación de la rodilla derecha (operada) se limpió de músculo y de tejido conjuntivo y se recogió en formalina tamponada neutra al 10 %. Se separó la rótula para permitir la fijación apropiada de las articulaciones. También se pusieron en formalina muestras de la tráquea, esternón, y oído.

Resultados evaluados a las 6 semanas post-cirugía

25 Controles no tratados (evaluados a las 6 semanas post-cirugía)

Los animales no tratados con desgarro meniscal medial con los que se terminó a las 6 semanas post-cirugía tenían degeneración del cartílago tibial que era más severa en los $\frac{2}{3}$ externos de la meseta tibial y menos severa en el $\frac{1}{3}$ interno. Los osteofitos eran grandes (media 468 μ m). La degeneración del cartílago femoral era más suave y más variable que la degeneración tibial. Los animales tratados con solución salina una vez a la semana tenían una puntuación de la degeneración total del cartílago tibial en la zona 3 significativamente más baja (16 %), y una relación de profundidad significativamente más baja (16 %), y un área de cartílago viable significativamente más grande en la tibia lateral en comparación con los animales no tratados (13 %). Los animales tratados con solución salina 3 veces a la semana tenían una puntuación de la degeneración del cartílago significativamente más baja en la zona 2 de la tibia (24 %), una relación de profundidad significativamente más baja (13 %), y un área de cartílago viable significativamente más grande tanto en la tibia medial como en la tibia lateral (15 y 14 %). Estas diferencias en los grupos control son probablemente el resultado de sucesos de anestesia repetidos que influyen en la actividad total de los animales, aunque no se puede descartar la posibilidad de que las inyecciones salinas repetidas influyan en la gravedad de la lesión facilitando la separación de mediadores y residuos.

Tratamiento de dosis única (evaluado a las 6 semanas post-cirugía)

- 40 Los animales que recibieron una dosis única de 10 μ g de FGF-18(170AA) tuvieron una anchura de degeneración total de cartílago significativamente más grande (16 %) debido a un aumento de la pérdida de proteoglicano en la zona 3. Las puntuaciones y medidas de los osteofitos aumentaron significativamente (19 y 25 %, respectivamente)

en los animales que recibieron una dosis única de 10 µg de FGF-18(170AA). El área de la matriz de cartílago viable en la tibia medial aumentó significativamente en un 27 % en los animales tratados con 10 µg. La inmunotinción reveló inmunopositividad a la bromodesoxiuridina (BRDU) en la médula fibrótica subyacente a las lesiones de cartílago y en las células de la médula ósea, fibroblastos, y cartílago con osteofitos, con similares patrones de tinción en las articulaciones tratadas con solución salina y las tratadas con FGF-18(170AA). Estos resultados indican que una única inyección de 10 µg de FGF-18(170AA) tenía un efecto anabólico definido, como se ve por el aumento del tamaño de los osteofitos y el aumento del área del cartílago tibial medial. Sin embargo, estos cambios no fueron suficientes para mejorar la puntuación de la degeneración global del cartílago. Es probable que el aumento del área del cartílago medial sea el resultado del aumento del espesor del cartílago en la superficie que lleva la carga adyacente al osteofito.

Tratamiento de una vez por semana durante 3 semanas (evaluado a las 6 semanas post-cirugía)

Los animales tratados con 3 µg de FGF-18(170AA) una vez por semana tuvieron puntuaciones de degeneración del cartílago significativamente más bajas en comparación con el control tratado con solución salina una vez por semana en la zona 2 de la tibia medial. Los animales que recibieron 10 µg de FGF-18(170AA) tuvieron una anchura de degeneración significativa, significativamente más baja (37 %), y los que recibieron 3 µg (28 %) o 1 µg (15 %) también tuvieron algo de inhibición. Las puntuaciones y medidas de los osteofitos fueron dependientes de las dosis y aumentaron significativamente por el tratamiento con 10 (32 y 53 %) o 3 (21 y 32 %) µg de FGF-18(170AA). El área de la matriz de cartílago viable en la tibia medial aumentó significativamente por el tratamiento con 10 µg de FGF-18(170AA) (27 %). Fue evidente la sinovitis activa crónica de suave a marcada con fibrosis en las articulaciones inyectadas con 10 o 3 µg y las inyectadas con 1 µg tuvieron sinovitis mínima. La resorción ósea subcondral aumentó mínimamente en algunas articulaciones tratadas con 10 µg. Los animales tratados con 3 o 10 µg de FGF-18(170AA) habían aumentado la tinción con BRDU en la médula fibrótica, sinovio, y en áreas de condrogénesis u osteofitos, en comparación con los controles de solución salina. Estos resultados demostraron el beneficio de respuesta a la dosis del tratamiento que utiliza el paradigma de una vez por semana sobre la anchura de la degeneración significativa del cartílago. Este parámetro es indicativo en gran medida de la presencia de una matriz viable de algún tipo dentro del área defectuosa y, junto con las áreas del cartílago tibial medial, demuestra la respuesta anabólica. Los resultados del marcado con BRDU indican respuestas proliferativas continuadas después del cese de la administración.

Tratamiento de tres veces por semana durante 3 semanas (evaluado a las 6 semanas post-cirugía)

El tratamiento con 1, 3 o 10 µg de FGF-18(170AA) administrado como 3 inyecciones por semana produjo una reducción significativa en las puntuaciones de la degeneración del cartílago tibial en comparación con el control de 3 veces por semana de solución salina en la zona 1 (animales tratados con 10 µg), zona 2 (1 o 3 µg), y la zona 3 total (1 o 3 µg). El tratamiento con 10 µg aumentó significativamente la anchura de la degeneración total del cartílago tibial en un 24 %. El tratamiento con 1 o 3 µg disminuyó no significativamente la anchura de la degeneración del cartílago en un 24 % y 21 % respectivamente, lo que indica algún efecto beneficioso. Los animales tratados con 1 o 3 µg de FGF-18(170AA) tuvieron también relaciones de profundidad significativamente más bajas (17 % y 18 % respectivamente) que los controles tratados con solución salina. La puntuación de los osteofitos tibiales mediales aumentó después del tratamiento con 0,3, 1, 3 o 10 µg de FGF-18(170AA) (13 %, 7 %, 13 % y 15 % respectivamente), mientras que las 4 dosis (0,3, 1, 3 o 10 µg de FGF-18(170AA)) aumentaron significativamente la medida de los osteofitos (12, 18, 60 y 62 %, respectivamente). El tratamiento con 10 µg aumentó significativamente la puntuación de la degeneración del cartílago femoral en un 114 %. Las puntuaciones de los huesos aumentaron significativamente por el tratamiento con 3 (60 %) o 10 (88 %) µg de FGF-18(170AA). La puntuación total de la articulación sin el fémur disminuyó significativamente por el tratamiento con 3 µg de FGF-18(170AA) (13 %), pero la adición del fémur a la puntuación total de la articulación eliminó dicha variación. El tratamiento con 1, 3 o 10 µg de FGF-18(170AA) aumentó significativamente el área de cartílago viable en la tibia medial (13 %, 29 % y 29 %), y el tratamiento con 3 o 10 µg aumentó significativamente el área en la tibia lateral (22 % y 13 %). Las articulaciones inyectadas con 3 o 10 µg tenían sinovitis de marcada a severa con aumento de la resorción ósea subcondral y se observaron cambios similares pero de suaves a moderados en las articulaciones tratadas con 1 µg. Los animales tratados con 1, 3 o 10 µg de FGF-18(170AA) tenían tinción por BRDU en numerosas áreas incluyendo médula, osteofitos, menisco, sinovio, y áreas de condrogénesis. Estos resultados demostraron los efectos anabólicos más pronunciados de cualquier paradigma de tratamiento, pero iban acompañados de inflamación sinovial severa y aumento de la resorción ósea subcondral.

Resultados evaluados a las 9 semanas post-cirugía

Controles no tratados (evaluados a las 9 semanas post-cirugía)

Los animales no tratados con desgarro del menisco medial que fueron terminados a las 9 semanas tenían degeneración del cartílago tibial que era mucho más severa en los $\frac{2}{3}$ externos de la meseta tibial y menos severa en el $\frac{1}{3}$ interno. La degeneración del cartílago femoral era menos severa y más variable. Las puntuaciones fueron en general, más altas que en los animales no tratados que terminaron en la semana 6. Los controles que recibieron solución salina en dosis única tuvieron puntuaciones de la degeneración del cartílago significativamente más bajas en la zona 2 de la tibia (12 %) que las de los controles que recibieron solución salina una vez por semana (18 %). Los controles con solución salina en dosis única tuvieron también una anchura de degeneración de colágeno

moderada significativamente más grande (92 %). Los animales que recibieron solución salina una vez por semana tenían una suma de la degeneración de colágeno severa, marcada, moderada, y leve (15 %), significativamente más baja que la de los animales control que recibieron solución salina 3 veces por semana (22 %). Estas diferencias fueron relativamente menores porque había solamente 5 ratas en cada uno de estos grupos y fueron un resultado de variación en el progreso de la enfermedad en los individuos.

Dosis única (evaluados a las 9 semanas post-cirugía, incluyendo 3 semanas post-tratamiento)

No hubo ningún efecto significativo de tratamiento en ninguno de los animales que recibieron una dosis única de FGF-18(170AA) y que terminaron 9 semanas después de la cirugía, aunque algunas articulaciones inyectadas con 10 µg presentaron signos de respuesta anabólica en la tibia lateral.

Una vez por semana durante 3 semanas (evaluado a las 9 semanas post-cirugía, incluyendo 3 semanas post-tratamiento)

Después de tratamiento con 10 µg de FGF-18(170AA) una vez por semana, se observaron reducciones significativas de las puntuaciones de la degeneración del cartílago en la zona 1 y en la zona 3 totales de la tibia medial en un 38 y un 31 %. El tratamiento con 0,3 µg de FGF-18(170AA) redujo significativamente las puntuaciones de la zona 2 en comparación con el control que recibió solución salina una vez por semana. Los animales tratados con 10 µg de FGF-18(170AA) tuvieron una anchura de degeneración significativa del cartílago significativamente más baja (38 %). Las relaciones de profundidad se redujeron significativamente por el tratamiento con 10 µg de FGF-18(170AA) (22 %). El tratamiento con 3 o 10 µg de FGF-18(170AA) aumentó significativa e idénticamente las puntuaciones de los osteofitos (25 %), pero solamente los animales que recibieron 10 µg tenían medidas de osteofitos significativamente aumentadas (53 %). Hubo un descenso significativo del 23 % en la puntuación total de la articulación con fémur en los animales que recibieron 10 µg de FGF-18(170AA). El área de cartílago viable aumentó significativamente en los animales que recibieron 10 µg de FGF-18(170AA) tanto en la tibia medial (40 %) como en la tibia lateral (81 %). El tratamiento con 10 µg de FGF-18(170AA) redujo significativamente la anchura de la degeneración de colágeno severa y mínima, así como la anchura de la degeneración combinada severa, marcada, y moderada y la anchura de la degeneración combinada severa y marcada. La inflamación sinovial fue mínima en las articulaciones inyectadas con 3 o 10 µg y estuvo ausente a dosis más bajas. Las respuestas anabólicas fueron claras en algunas o en todas las articulaciones inyectadas con cualquier dosis. La tinción de BRDU se vio principalmente en la médula ósea y en los fibroblastos de los controles con solución salina y se vio un aumento de la tinción (cartílago y osteofitos) en las articulaciones inyectadas con 10 µg. Estos resultados indican que la reparación del cartílago y las respuestas anabólicas continuaron después del periodo de tratamiento y que la sinovitis disminuyó, aunque las medidas de los osteofitos fueron comparables a las 6 o 9 semanas en las articulaciones tratadas con esta dosis. Se vieron beneficios como respuesta a la dosis utilizando el parámetro significativo de degeneración del cartílago y mejoró la pérdida severa de la matriz, medida por la degeneración del colágeno.

Tres veces por semana durante 3 semanas (evaluado a las 9 semanas post-cirugía, incluyendo 3 semanas post-tratamiento)

La puntuación de la degeneración del cartílago tibial total de la zona 3 se redujo significativamente en un 38 % en los animales que recibieron 10 µg de FGF-18(170AA) como 3 inyecciones por semana, en comparación con el control que recibió solución salina 3 veces por semana. El tratamiento con 10 µg de FGF-18(170AA) redujo también significativamente la anchura de la degeneración significativa del cartílago (48 %). La relación de profundidad se redujo significativamente en un 27 % en los animales tratados con 10 µg de FGF-18(170AA). Las medidas de osteofitos aumentaron significativamente en los animales tratados con 3 (57 %) o 10 (103 %) µg de FGF-18(170AA). El tratamiento con 1, 3, o 10 µg de FGF-18(170AA) aumentó significativamente el área de cartílago viable en la tibia medial (34 %, 37 % y 71 % respectivamente), mientras que el tratamiento con 0,3 o 10 µg de FGF-18(170AA) aumentó significativamente las áreas en la tibia lateral (46 % y 67 %). La anchura de la degeneración suave del colágeno aumentó significativamente en los animales tratados con 3 o 10 µg de FGF-18(170AA), como lo fue la anchura de la degeneración suave y mínima combinada en los animales que recibieron 10 µg. La sinovitis suave estuvo presente en todas las articulaciones inyectadas con 10 µg (divididos) y la sinovitis de mínima a suave estuvo presente en los que recibieron 1 o 3 µg. Las respuestas anabólicas fueron evidentes desde 1 µg hacia arriba. La tinción de BRDU se vio principalmente en la médula ósea y fibroblastos de los controles que recibieron solución salina y se vio un aumento de la tinción (cartílago y osteofitos) en las articulaciones inyectadas con 10 µg. Estos resultados indicaron que la reparación del cartílago y las respuestas anabólicas continuaron después del periodo de tratamiento y que la sinovitis disminuyó, en comparación con el punto de tiempo de 6 semanas. Los efectos beneficiosos sobre la pérdida de colágeno fueron menos claros, aunque hubo una tendencia definida hacia medidas más pequeñas de las áreas de pérdida marcada a severa.

EJEMPLO 1.2: Modelo de OA por menisectomía en perro

Se trataron perros beagle hembras (n=3/grupo) que habían sufrido una menisectomía medial unilateral parcial en la rodilla izquierda un mes antes de la iniciación del tratamiento, con solución salina o 3, 10, o 30 µg de FGF-18(170AA) una vez, una vez por semana, o tres veces por semana (dosis dividida a 1/3) durante 3 semanas para determinar los efectos beneficiosos sobre la OA establecida.

Después de 3 semanas de tratamiento, se evaluaron las rodillas izquierdas en cuanto a los efectos sobre los cambios evidentes (n=3/grupo) y microscópicos (n=3/grupo) inducidos por la menisectomía y en cuanto a los signos de efectos anabólicos. Todos los perros excepto uno presentaron apetito y actividad normales a lo largo de todo el estudio. Un perro (YLI-8) del grupo 12 murió antes de la terminación (día 17) debido a neumonía de aspiración asociada con la anestesia repetida para las inyecciones en la articulación. Se presentaron cambios degenerativos típicos caracterizados por la presencia de lesiones focales, bien circunscritas de degeneración de cartílago en las tibias mediales de todos los perros operados en todos los grupos. Se observaron esporádicamente lesiones femorales. Todos los perros tenían un espesamiento mínimo de la cápsula articular medial. El daño del menisco (aproximadamente, la mitad ausente en la necropsia y en general ninguna reparación o reparación moderada) fue similar en todos los grupos.

La evaluación microscópica reveló que las rodillas no tratadas y las tratadas con vehículo tenían a menudo hipertrofia de cartílago con clonación en la zona 1 de niveles 1 y 2. Se observaron efectos anabólicos definidos (aumento de clonación, celularidad, y tinción de proteoglicano en las áreas lesionadas) en las rodillas tratadas con 30 µg (10 µg tres veces por semana) de FGF-18(170AA), y estos cambios fueron más identificables en los condilos femorales. Se observaron menos efectos anabólicos, pero aún convincentes, en algunas rodillas tratadas 3 veces por semana con las dosis más bajas de FGF-18(170AA), o en las rodillas tratadas con 30 o 10 µg una vez por semana. Cuando se presentaban, estos cambios inducidos por FGF-18(170AA) estaban en general en 1/3 a 1/2 de la parte superior del cartílago o en la matriz adyacente a las fisuras más profundas.

Los resultados de este estudio demostraron efectos anabólicos definidos del tratamiento i.a. con 10 µg de FGF-18(170AA) 3 veces por semana (30 µg total/semana) en todas las rodillas y menos efectos en algunas rodillas tratadas con dosis más bajas 3 veces por semana o con 30 o 10 µg una vez por semana. Los cambios consistieron en clonación, aumento de la síntesis de proteoglicano en 1/3 a 1/2 de la parte superior del cartílago o en la matriz adyacente a las fisuras. Se observaron cambios proliferativos suaves en la zona marginal en algunas articulaciones pero no hubo excesivos cambios similares a los que aparecen en las ratas. Los cambios anabólicos en el cartílago articular fueron mayores que los cambios anabólicos de las zonas marginales en todos los casos. Las medidas del daño del colágeno también dieron a entender alguna protección de la integridad de la matriz.

EJEMPLO 1.3: Modelo de ligamento cruzado anterior (ACL) en perro

Para investigaciones sobre la osteoartritis severa progresiva, se utiliza el modelo de ligamento cruzado anterior (ACL) en perro para investigaciones de farmacología preclínica, incluyendo la evaluación por MRI (imagen de resonancia magnética) al final del tratamiento y en el seguimiento. Este modelo proporciona datos de eficacia (histopatológicos y MRI a lo largo del tiempo y seguimiento) junto con datos sobre la función por medio de análisis de la forma de andar (análisis gait).

Utilizando una MRI de lectura no invasiva, ya al final del tratamiento fue demostrable una reducción en las lesiones del cartílago en comparación con la línea base sana (-13,3, -7,5, -9,3 y -8,8 para el vehículo, 3 µg/articulación, 10 µg/articulación y 30 µg/articulación, respectivamente). También es demostrable al final de la terapia una mejoría funcional medida por análisis de la forma de andar sobre una plataforma de fuerza: el análisis de la forma de andar (análisis gait) se realizó utilizando una medida de fuerza/presión basada en una plataforma (Matscan® System, Tekscan Inc, Boston, Mass., USA).

Procedimientos de medida de la forma de andar

El sistema Matscan® comprende 4 plataformas de paseo, que tiene cada una 2.288 elementos sensores incluidos en un área sensora de 432 mm × 368 mm, produciendo una resolución espacial de 1,4 sensels/cm². Se calibró este dispositivo con un peso predefinido al comienzo del estudio y se usó la misma calibración para todos los perros a lo largo de todo el estudio.

Para la extremidad trasera con osteoartritis inducida, el pico de fuerza vertical y el área de contacto se determinaron a una velocidad de andar al trote que varía de 1,9 a 2,2 metros/segundo. Se aseguró la velocidad utilizando un cronómetro. La ventana de medida de la marcha fue de 3 segundos con una tasa de muestreo fijada a 44 hertz, produciendo un total de 132 marcos. Se obtuvieron para cada perro los 5 primeros ensayos válidos y después se hizo la media para caracterizar el perfil por perro a un punto dado de tiempo. El pico de fuerza vertical se expresó en porcentaje de peso corporal (% PC) y el área de contacto se expresó en centímetros cuadrados (cm²).

Con respecto al pico de fuerza vertical de la extremidad trasera con osteoartritis inducida medido en el trote, el modelo de osteoartritis canina produjo una forma de caminar anormal (semana 4) perceptible sobre los valores preoperatorios (línea base). Se observaron reducciones del pico de fuerza vertical y del área de contacto 4 y 8 semanas después de la cirugía, como cambios negativos en todos los grupos (Tablas 3 y 4). Sin embargo en los perros del Grupo IV a las 8 semanas después de la cirugía, hubo una tendencia a tener una reducción menos severa comparada con la línea base frente a los otros grupos.

Tabla 3

Pico de fuerza vertical adquirida en el trote (suceso dinámico) para la extremidad trasera con osteoartritis inducida

| Grupo | Animales (n) | Pico de fuerza vertical ^a Semana 4 (% peso corporal) ^b | Semana 8 (% peso corporal) ^b |
|-----------------------------------|--------------|--|--|
| I OA: control placebo | 8 | -37,34 ± 5,68 | -27,45 ± 3,90 |
| II FGF-18: 3 µg/articulación | 8 | -34,84 ± 3,65 | -22,08 ± 2,87 |
| III FGF-18: 10 µg/articulación | 8 | -36,59 ± 3,14 | -25,11 ± 3,03 |
| IV FGF-18: 30 µg/articulación | 8 | -32,28 ± 3,05 | -15,71 ± 1,85 |

^aLos valores presentados son la media ± SEM. Los valores son los cambios sobre la línea base

^bLos valores se expresan en porcentaje de peso corporal (%PC)

TABLA 4

Área de contacto adquirida en el trote (suceso dinámico) para la extremidad trasera con osteoartritis inducida

| Grupo | Animales (n) | Área de contacto ^a Semana 4 (cm ²) ^b | Semana 8 (cm ²) ^b |
|-----------------------------------|--------------|--|---|
| I OA: control placebo | 8 | -11,17 ± 2,61 | -7,11 ± 1,55 |
| II FGF-18: 3 µg/articulación | 8 | -11,50 ± 1,41 | -4,95 ± 0,78 |
| III FGF-18: 10 µg/articulación | 8 | -10,45 ± 1,63 | -4,92 ± 1,47 |
| IV FGF-18: 30 µg/articulación | 8 | -10,22 ± 1,52 | -3,90 ± 0,93 |

^aLos valores presentados son la media ± SEM. Los valores son los cambios sobre la línea base

^bLos valores se expresan en centímetros cuadrados (cm²)

5

Los resultados de la farmacología *in vitro* demostraron actividad específica sobre los condrocitos (proliferación y regeneración de cartílago/síntesis de colágeno) y la ausencia de efectos adversos como la proliferación de leucocitos o la liberación de citocina por diferentes tipos de células después de exposición a FGF-18(170AA).

EJEMPLO 1.4: Investigaciones utilizando FGF18 [3H]-FGF18 radiomarcado

- 10 Los niveles de radiactividad encontrados en la articulación de la rodilla después de administración intra-articular de [3H]-FGF18 se presentan en la Tala 5 (como concentraciones de radiactividad total, expresada como equivalentes ng/g) y en la Tabla 6 (expresados como porcentajes de dosis administrada); en las tablas se presentan los niveles de radiactividad determinados en las articulaciones tratadas analizadas de ambos modos, como articulación intacta de la rodilla y después de la recogida del líquido sinovial. Los correspondientes parámetros farmacocinéticos en la
- 15 articulación de la rodilla, con o sin líquido sinovial, se presentan en la Tabla 7.

TABLA 5

Concentraciones de radiactividad total en la articulación de la rodilla después de una administración intra-articular individual de [³H]-AS902330 a un nivel de dosis diana de 0,24 mg/kg a ratas macho. Los resultados se expresan como equivalentes ng/g.

| Muestra | Tiempo | Grupo 4 articulación completa | Grupo 3 articulación sin líquido sinovial | Relación articulación sin líquido sinovial/ articulación completa |
|----------------------------|--------|----------------------------------|--|---|
| Articulación de la rodilla | 15 min | 26037 | 11740 | 0,45 |
| | 1 h | 13320 | 9086,7 | 0,68 |
| | 4 h | 15270 | 9664,1 | 0,63 |
| | 24 h | 6167,9 | 4054,3 | 0,66 |
| | 48 h | 3376,3 | 1450,8 | 0,43 |

20

TABLA 6

Recuperación de la radiactividad total en la articulación de la rodilla después de una administración intra-articular individual de [³H]-AS902330 a un nivel de dosis diana de 0,24 mg/kg a ratas macho. Los resultados se expresan como % de la dosis administrada

| Muestra | Tiempo | Grupo 4 articulación completa | Grupo 3 articulación sin líquido sinovial | Relación articulación sin líquido sinovial/ articulación completa |
|----------------------------|--------|-------------------------------------|---|---|
| Articulación de la rodilla | 15 min | 87,87 | 66,23 | 0,75 |
| | 1 h | 78,43 | 67,39 | 0,86 |
| | 4 h | 70,94 | 40,92 | 0,58 |
| | 24 h | 28,62 | 14,09 | 0,49 |
| | 48 h | 21,61 | 8,29 | 0,38 |

5

TABLA 7

Parámetros de exposición sistémica de radiactividad total en la articulación de la rodilla después de una administración intra-articular individual de [³H]-AS902330 a un nivel de dosis diana de 0,24 mg/kg a ratas macho.

| | Grupo 3 articulación sin líquido sinovial | Grupo 4 articulación completa | Relación articulación sin líquido sinovial/ articulación completa |
|----------------------------------|---|-------------------------------------|---|
| C _{max} (ngeq/g) | 11740 | 26037 | 0,45 |
| Intervalo de regresión | 4-48 | 4-48 | |
| t _{1/2, z} (h) | 16 | 20 | |
| AUC(0-t, último) (eqng · h/g) | 242116 | 393063 | 0,62 |
| AUC(0-∞) (eqng · h/g) | 275787 | 492380 | 0,56 |

- 10 Los niveles de radiactividad total en la articulación tratada decayeron bifásicamente, con una semivida terminal de 20 horas. Se obtuvo un valor comparable teniendo en cuenta la articulación total sin líquido sinovial (16 horas). En conjunto, los resultados indicaron que la radiactividad total se distribuyó fuera del líquido sinovial en los tejidos de la articulación de la rodilla. Los resultados obtenidos después de análisis de autorradioluminografía de las articulaciones de rodilla tratadas, demostraron que la mayor parte de la radiactividad estaba localizada muy próxima a la articulación.
- 15

Los resultados de análisis de autorradioluminografía de todo el cuerpo después de administración intravenosa y administración intra-articular de [³H]-FGF18 se presentan en la Tabla 8 y en la Tabla 9, respectivamente. Las concentraciones de radiactividad total en tejidos y órganos se expresan como equivalentes ng/g (media ± SD).

TABLA 8

Concentraciones de radiactividad total después de una administración intravenosa individual de [³H]-AS902330 a un nivel de dosis diana de 0,24 mg/kg a ratas macho (Grupo 1). Los resultados se expresan como equivalentes ng/g (media ± SD).

| Tejido | 0,25 h | | 1 h | | 4 h | | 24 h | | 48 h | |
|-------------------------|--------|------|-------|------|-------|------|-------|------|-------|------|
| | Media | S.D. | Media | S.D. | Media | S.D. | Media | S.D. | Media | S.D. |
| Glándulas suprarrenales | | | | | 3890 | 2410 | 480 | 20 | 180 | |
| Sangre | | | | | 110 | 50 | | | | |
| Médula ósea | | | | | 460 | 120 | 790 | 210 | 420 | 90 |
| Riñones | | | | | 1170 | 400 | 770 | 180 | 440 | 220 |
| Hígado | | | | | 1210 | 260 | 560 | 110 | 310 | 150 |
| Pulmones | | | | | 200 | 90 | 150 | 40 | | |
| Páncreas | | | | | 210 | 40 | 220 | 60 | 80 | 20 |
| Glándulas salivares | | | | | 220 | 111 | 270 | 50 | 111 | 30 |
| Bazo | | | | | 690 | 260 | 440 | 30 | 260 | 40 |
| Testículos | | | | | | | 90 | 20 | | |
| Timo | | | | | | | 280 | 50 | 170 | |

* NQ: No cuantificable (por debajo del límite de cuantificación)

5

TABLA 9

Concentraciones de radiactividad total después de una administración intra-articular individual de [³H]-AS902330 a un nivel de dosis diana de 0,24 mg/kg a ratas macho (Grupo 2). Los resultados se expresan como equivalentes ng/g (media ± SD).

| Tejido | 0,25 h | | 1 h | | 4 h | | 24 h | | 48 h | |
|-------------------------|--------|------|-------|------|-------|-------|-------|------|-------|------|
| | Media | S.D. | Media | S.D. | Media | S.D. | Media | S.D. | Media | S.D. |
| Suprarrenal | | | | | | | | | | |
| Médula ósea | | | | | | | 170 | | 190 | 20 |
| Riñones | | | | | 120 | 20 | 90 | 20 | 90 | 30 |
| Hígado | | | | | 60 | 0,0 | 70 | 10 | 70 | 20 |
| Páncreas | | | | | | | | | | |
| Glándulas salivares | | | | | | | | | | |
| Bazo | | | | | | | | | 90 | 20 |
| Timo | | | | | | | | | | |
| Articulación de rodilla | | | | | 10720 | 57940 | 4128 | 2448 | 1184 | 4230 |

* NQ: No cuantificable (por debajo del límite de cuantificación)

10

Después de la administración intravenosa, la radiactividad total en sangre y suero alcanzó el nivel más alto a las 4 horas y 24 horas después de la administración, en suero y sangre, respectivamente. La semivida medida en suero fue de aproximadamente 55 horas. Después de la administración intra-articular las medias de radiactividad total aumentaron lentamente alcanzando la concentración más alta a las 24 y 48 horas después de la administración, en suero y sangre, respectivamente. La exposición sistémica fue aproximadamente el 20 % de la encontrada después de la administración intravenosa.

15

La radiactividad total en suero fue como media más alta que en la sangre, lo que sugiere que el compuesto original y/o sus metabolitos tienen una afinidad menor por las células sanguíneas y la radiactividad circulante se distribuyó principalmente en el suero.

20

Los niveles de radiactividad total en la articulación tratada decayeron bifásicamente con una semivida terminal de 20 horas. En conjunto, los resultados indicaron que la radiactividad total se distribuyó fuera del líquido sinovial en la articulación de la rodilla.

25

En conjunto, basándose en los modelos de farmacología no clínica en rata y perro, se encuentra que un régimen particularmente apropiado de administración es una vez por semana durante tres semanas. La dosis eficaz observada varía de 3-30 µg/articulación.

EJEMPLO 2: Ejemplos de compuestos FGF-18 de la invención

Las secuencias de los compuestos FGF-18 preferidos de la invención se dan en el listado de secuencias que sigue

LISTADO DE SECUENCIAS.

<110>

<120> TRATAMIENTO DE TRASTORNOS DEL CARTÍLAGO

<130> 1134

<160> 5

<170> PatentIn version 3.3

<210> 1

<211> 624

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 1

| | |
|---|-----|
| atgtattcag cgccctccgc ctgcacttgc ctgtgtttac acttctctgt gctgtgcttc | 60 |
| caggtacagg tgctggttgc cgaggagaac gtggacttcc gcatccacgt ggagaaccag | 120 |
| acgcgggctc gggacgatgt gagccgtaag cagctgcggc tgtaccagct ctacagccgg | 180 |
| accagtggga aacacatcca ggtcctgggc cgcaggatca gtgcccgcgg cgaggatggg | 240 |
| gacaagtatg cccagctcct agtggagaca gacaccttcg gtagtcaagt ccggatcaag | 300 |
| ggcaaggaga cggaattcta cctgtgcatg aaccgcaaag gcaagctcgt ggggaagccc | 360 |
| gatggcacca gcaaggagtg tgtgttcacg gagaaggttc tggagaacaa ctacacggcc | 420 |
| ctgatgtcgg ctaagtactc cggctggtac gtgggcttca ccaagaaggg gcggccgcgg | 480 |
| aagggcccca agaccggga gaaccagcag gacgtgcatt tcatgaagcg ctaccccaag | 540 |
| gggcagccgg agcttcagaa gcccttcaag tacacgacgg tgaccaagag gtcccgtcgg | 600 |

5

atccggccca cacaccctgc ctag

624

<210> 2

<211> 207

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 2

Met Tyr Ser Ala Pro Ser Ala Cys Thr Cys Leu Cys Leu His Phe Leu
1 5 10 15

Leu Leu Cys Phe Gln Val Gln Val Leu Val Ala Glu Glu Asn Val Asp
 20 25 30

Phe Arg Ile His Val Glu Asn Gln Thr Arg Ala Arg Asp Asp Val Ser
 35 40 45

Arg Lys Gln Leu Arg Leu Tyr Gln Leu Tyr Ser Arg Thr Ser Gly Lys
 50 55 60

His Ile Gln Val Leu Gly Arg Arg Ile Ser Ala Arg Gly Glu Asp Gly
65 70 75 80

Asp Lys Tyr Ala Gln Leu Leu Val Glu Thr Asp Thr Phe Gly Ser Gln
 85 90 95

Val Arg Ile Lys Gly Lys Glu Thr Glu Phe Tyr Leu Cys Met Asn Arg
 100 105 110

Lys Gly Lys Leu Val Gly Lys Pro Asp Gly Thr Ser Lys Glu Cys Val
 115 120 125

ES 2 392 883 T3

Phe Ile Glu Lys Val Leu Glu Asn Asn Tyr Thr Ala Leu Met Ser Ala
 130 135 140

Lys Tyr Ser Gly Trp Tyr Val Gly Phe Thr Lys Lys Gly Arg Pro Arg
 145 150 155 160

Lys Gly Pro Lys Thr Arg Glu Asn Gln Gln Asp Val His Phe Met Lys
 165 170 175

Arg Tyr Pro Lys Gly Gln Pro Glu Leu Gln Lys Pro Phe Lys Tyr Thr
 180 185 190

Thr Val Thr Lys Arg Ser Arg Arg Ile Arg Pro Thr His Pro Ala
 195 200 205

<210> 3

<211> 624

<212> DNA

<213> Mus musculus

<400> 3

atgtattcag cgcctccgc ctgcacttgc ctgtgtttac actttctact gctgtgettc 60
 caggttcagg tgttggcagc cgaggagaat gtggacttcc gcattccagt ggagaaccag 120
 acgcgggctc gagatgatgt gagtccgaag cagctgcctt tgtaccagct ctatagcagg 180
 accagtggga agcaccattca agtccctggc cgtaggatca gtgccctgg cgaggacggg 240
 gacaagtatg cccagctcct agtggagaca gataccttcg ggagtcaagt ccggatcaag 300
 ggcaaggaga cagaattctt cctgtgtatg aaccgaaaag gcaagctcgt ggggaagcct 360
 gatgtacta gcaaggagtg cgtgttcatt gagaaggttc tggaaaacaa ctacacggcc 420
 ctgatgtctg ccaagtactc tggttggtat gtgggcttca ccaagaagg gggcctcgc 480
 aagggtccca agaccgcga gaaccagcaa gatgtacact tcatgaagcg ttaccccaag 540

ES 2 392 883 T3

ggacagggcgg agctgcagaa gcccttcaaa tacaccacag tcaccaagcg atcccggcgg 600

atccgcccc ctcaccccg ctag 624

<210> 4

<211> 207

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 4

Met Tyr Ser Ala Pro Ser Ala Cys Thr Cys Leu Cys Leu His Phe Leu
1 5 10 15

Leu Leu Cys Phe Gln Val Gln Val Leu Ala Ala Glu Glu Asn Val Asp
20 25 30

Phe Arg Ile His Val Glu Asn Gln Thr Arg Ala Arg Asp Asp Val Ser
35 40 45

Arg Lys Gln Leu Arg Leu Tyr Gln Leu Tyr Ser Arg Thr Ser Gly Lys
50 55 60

His Ile Gln Val Leu Gly Arg Arg Ile Ser Ala Arg Gly Glu Asp Gly
65 70 75 80

Asp Lys Tyr Ala Gln Leu Leu Val Glu Thr Asp Thr Phe Gly Ser Gln
85 90 95

Val Arg Ile Lys Gly Lys Glu Thr Glu Phe Tyr Leu Cys Met Asn Arg
100 105 110

Lys Gly Lys Leu Val Gly Lys Pro Asp Gly Thr Ser Lys Glu Cys Val
115 120 125

ES 2 392 883 T3

Phe Ile Glu Lys Val Leu Glu Asn Asn Tyr Thr Ala Leu Met Ser Ala
130 135 140

Lys Tyr Ser Gly Trp Tyr Val Gly Phe Thr Lys Lys Gly Arg Pro Arg
145 150 155 160

Lys Gly Pro Lys Thr Arg Glu Asn Gln Gln Asp Val His Phe Met Lys
165 170 175

Arg Tyr Pro Lys Gly Gln Ala Glu Leu Gln Lys Pro Phe Lys Tyr Thr
180 185 190

Thr Val Thr Lys Arg Ser Arg Arg Ile Arg Pro Thr His Pro Gly
195 200 205

<210> 5
<211> 170
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> FGF18 (170AA)

<400> 5

Met Glu Glu Asn Val Asp Phe Arg Ile His Val Glu Asn Gln Thr Arg
1 5 10 15

Ala Arg Asp Asp Val Ser Arg Lys Gln Leu Arg Leu Tyr Gln Leu Tyr
20 25 30

Ser Arg Thr Ser Gly Lys His Ile Gln Val Leu Gly Arg Arg Ile Ser
35 40 45

ES 2 392 883 T3

Ala Arg Gly Glu Asp Gly Asp Lys Tyr Ala Gln Leu Leu Val Glu Thr
50 55 60

Asp Thr Phe Gly Ser Gln Val Arg Ile Lys Gly Lys Glu Thr Glu Phe
65 70 75 80

Tyr Leu Cys Met Asn Arg Lys Gly Lys Leu Val Gly Lys Pro Asp Gly
85 90 95

Thr Ser Lys Glu Cys Val Phe Ile Glu Lys Val Leu Glu Asn Asn Tyr
100 105 110

Thr Ala Leu Met Ser Ala Lys Tyr Ser Gly Trp Tyr Val Gly Phe Thr
115 120 125

Lys Lys Gly Arg Pro Arg Lys Gly Pro Lys Thr Arg Glu Asn Gln Gln
130 135 140

Asp Val His Phe Met Lys Arg Tyr Pro Lys Gly Gln Pro Glu Leu Gln
145 150 155 160

Lys Pro Phe Lys Tyr Thr Thr Val Thr Lys
165 170

REIVINDICACIONES

1. Un compuesto FGF-18 para uso en el tratamiento de un trastorno de cartílago, en el que el compuesto FGF-18 se debe administrar durante al menos 3 semanas consecutivas por ciclo de tratamiento, estando separadas dichas administraciones por aproximadamente 6, 7 u 8 días.
- 5 2. El compuesto FGF-18 para uso según la reivindicación 1, en el que dichas administraciones están separadas por aproximadamente 7 días una de otra.
3. El compuesto FGF-18 para uso según cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que el compuesto FGF-18 se debe administrar durante al menos 3 semanas consecutivas o 4 semanas consecutivas por ciclo de tratamiento.
- 10 4. El compuesto FGF-18 para uso según cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que los ciclos de tratamiento se repiten después de 2, 4, 6 u 8 meses.
5. El compuesto FGF-18 para uso según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, que comprende 1, 2, 3, 4, 5 o 6 ciclos de tratamiento por año.
6. El compuesto FGF-18 para uso según cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que el compuesto FGF-18 se debe administrar intra-articularmente.
- 15 7. El compuesto FGF-18 para uso según la reivindicación 6, en el que el compuesto FGF-18 se debe administrar a una dosis de 1-100 mcg, preferiblemente 5-40 mcg, preferiblemente 10-30 mcg por administración intra-articular individual.
- 20 8. El compuesto FGF-18 para uso según la reivindicación 7, en el que el compuesto FGF-18 se debe administrar a una dosis de aproximadamente 3, 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60 mcg por administración intra-articular individual del compuesto FGF-18.
9. El compuesto FGF-18 para uso según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en el que el compuesto FGF-18 se debe administrar intravenosamente a una dosis de 50-200 mcg, preferiblemente 80-120 mcg por administración intravenosa individual del compuesto FGF-18.
- 25 10. El compuesto FGF-18 para uso según cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que el trastorno del cartílago es osteoartritis.
11. El compuesto FGF-18 para uso según la reivindicación 10, en el que la osteoartritis se clasifica como osteoartritis de suave a moderada, grado II o grado III según la OARSI, osteoartritis progresiva severa o y/o grado IV según la OARSI.
- 30 12. El compuesto FGF-18 para uso según la reivindicación 10 u 11, en el que la osteoartritis es osteoartritis de rodilla u osteoartritis de cadera, tal como osteoartritis secundaria de cadera.
13. El compuesto FGF-18 para uso según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, en el que el trastorno del cartílago es una lesión del cartílago.
- 35 14. El compuesto FGF-18 para uso según cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que el compuesto FGF-18 se selecciona de la forma madura de FGF-18 humano que comprende los residuos 28-207 de la SEQ. ID. NO:2 o FGF-18(170AA).
15. El compuesto FGF-18 para uso según cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que el compuesto FGF-18 se debe administrar una vez por semana durante 3 semanas.