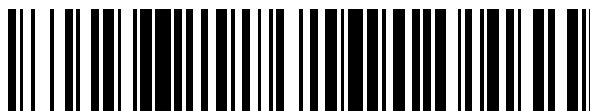


19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 465 141**

51 Int. Cl.:

|                   |                             |           |
|-------------------|-----------------------------|-----------|
| <b>A61K 45/00</b> | (2006.01) <b>A61P 31/06</b> | (2006.01) |
| <b>A61K 38/00</b> | (2006.01) <b>A61P 31/10</b> | (2006.01) |
| <b>A61K 45/06</b> | (2006.01) <b>A61P 31/12</b> | (2006.01) |
| <b>A61P 17/00</b> | (2006.01) <b>A61P 37/02</b> | (2006.01) |
| <b>A61P 17/06</b> | (2006.01) <b>A61P 43/00</b> | (2006.01) |
| <b>A61P 19/02</b> | (2006.01)                   |           |
| <b>A61P 19/06</b> | (2006.01)                   |           |
| <b>A61P 19/10</b> | (2006.01)                   |           |
| <b>A61P 29/00</b> | (2006.01)                   |           |
| <b>A61P 31/04</b> | (2006.01)                   |           |

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **31.03.2005** **E 05728888 (8)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **07.05.2014** **EP 1759710**

54 Título: **Remedio o medicamento preventivo para la artritis**

30 Prioridad:

**31.03.2004 JP 2004107924**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:

**05.06.2014**

73 Titular/es:

**NAKAO, KAZUWA (50.0%)**  
**4-1-2, Kitakutsukake-cho, Ohe Nishikyo-ku**  
**Kyoto-shi, Kyoto 610-1101, JP y**  
**CHUGAI SEIYAKU KABUSHIKI KAISHA (50.0%)**

72 Inventor/es:

**NAKAO, KAZUWA y**  
**KITAMURA, HIDETOMO**

74 Agente/Representante:

**UNGRÍA LÓPEZ, Javier**

ES 2 465 141 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**

Remedio o medicamento preventivo para la artritis

5 **Campo Técnico**

La invención se refiere a una composición farmacéutica que comprende un activador de la guanil ciclasa B (GC-B) para su uso en

- 10 (a) la inhibición de la artritis, en donde la artritis es inhibida mediante la activación de GC-B; o
- (b) la inhibición de la degeneración del cartílago articular en la osteoartritis mediante el aumento del crecimiento de los condrocitos articulares, en donde dicho crecimiento se incrementa mediante la activación de GC-B, en donde el activador de GC-B es un péptido natriurético tipo C (CNP) o un derivado del mismo, en donde
- 15 el CNP se selecciona del grupo que consiste en CNP-22 del SEQ ID NO: 1 y CNP-53 del SEQ ID NO: 2, y en donde el derivado se selecciona del grupo que consiste en un péptido activador de GC-B que tiene la secuencia de aminoácidos del SEQ ID NO: 1 en la que de 1 a 10 aminoácidos son sustituidos, suprimidos, o añadidos y que tiene una actividad de activación de GC-B y un péptido activador de GC-B que tiene la secuencia de aminoácidos del SEQ ID NO: 2 en la que de 1 a 10 aminoácidos son sustituidos, suprimidos,
- 20 o añadidos y que tiene una actividad de activación de GC-B. Además, la invención se refiere al uso de un activador de la guanil ciclasa B (GC-B) para la preparación de una composición farmacéutica para

- (a) la inhibición de la artritis, en donde la artritis es inhibida mediante la activación de GC-B; o
- 25 (b) la inhibición de la degeneración de cartílago articular en la osteoartritis mediante el aumento del crecimiento de los condrocitos articulares, en donde dicho crecimiento se incrementa mediante la activación de GC-B,

- en donde el activador de GC-B es un péptido natriurético tipo C (CNP) o un derivado del mismo, en donde el CNP se selecciona del grupo que consiste en CNP-22 del SEQ ID NO: 1 y CNP-53 del SEQ ID NO: 2, y en donde el derivado se selecciona del grupo que consiste en un péptido activador de GC-B que tiene la secuencia de aminoácidos del
- 30 SEQ ID NO: 1 en la que de 1 a 10 aminoácidos son sustituidos, suprimidos, o añadidos y que tiene una actividad de activación de GC-B y un péptido activador de GC-B que tiene la secuencia de aminoácidos del SEQ ID NO: 2 en la que de 1 a 10 aminoácidos son sustituidos, suprimidos, o añadidos y que tiene una actividad de activación de GC-B. La presente invención también se refiere a una combinación de un activador de GC-B y un inhibidor de la ciclooxigenasa para su uso en la inhibición de la artritis, en donde la artritis es inhibida mediante la activación de GC-B y en donde el activador de GC-B es un péptido natriurético tipo C (CNP) o un derivado del mismo, en donde el CNP se selecciona del grupo que consiste en CNP-22 del SEQ ID NO: 1 y CNP-53 del SEQ ID NO: 2, y en donde el derivado se selecciona del grupo que consiste en un péptido activador de GC-B que tiene la secuencia de aminoácidos del SEQ ID NO: 1 en la que de 1 a 10 aminoácidos son sustituidos, suprimidos, o añadidos y que tiene una actividad de activación de GC-B y un péptido activador de GC-B que tiene la secuencia de aminoácidos del SEQ
- 35 ID NO: 2 en la que de 1 a 10 aminoácidos son sustituidos, suprimidos, o añadidos y que tiene una actividad de activación de GC-B. La descripción se refiere en términos generales a un agente un agente terapéutico o profiláctico para la artritis, particularmente la osteoartritis y tipos similares de enfermedades artríticas, o un agente para promover el crecimiento de condrocitos articulares, o un método para inhibir la artritis o un método para promover el crecimiento de condrocitos articulares, utilizando un activador de la guanil ciclasa B (referido más adelante como "GC-B"). La invención se refiere adicionalmente a un método para escrutar un agente terapéutico para la artritis o un promotor del crecimiento de condrocitos utilizando la actividad de GC-B como indicación.
- 40
- 45

50 **Técnica Anterior**

- La artritis es una enfermedad inflamatoria de las articulaciones, y la artritis reumatoide y la osteoartritis (o osteoartrosis) son trastornos artríticos prevalentes.
- 55 Se considera que la artritis reumatoide es una enfermedad autoinmunitaria, acompañada de dolor articular, rigidez e hinchazón, y a medida que la enfermedad progresa, puede conducir con frecuencia a la degeneración de las superficies del cartílago articular de manera similar a la osteoartritis, dando como resultado la destrucción severa del hueso y del cartílago articular.
- La osteoartritis es una enfermedad degenerativa del cartílago articular que se produce con frecuencia en personas de edad avanzada. La osteoartritis (OA) implica destrucción del cartílago y cambio proliferativo en el hueso y el cartílago resultantes de la degeneración de los componentes articulares, dando como resultado el cambio una artritis secundaria (p. ej., sinovitis). La osteoartritis se produce principalmente en articulaciones que cargan peso, tales
- 60

como las articulaciones de las rodillas, los codos, y las caderas (Virchows Arch 1996; 260:521-663), y menos frecuentemente en articulaciones que no cargan peso, tales como las articulaciones del hombro/codo y manos. Además, se ha identificado artrosis temporomandibular con condiciones similares en la articulación temporomandibular (J Orofac Pain 1999; 13(4): 295-306).

Se sabe que las proteínas de la matriz, que son la entidad funcional del cartílago, son reducidas, y el número de condrocitos disminuye en la osteoartritis (Arth Rheum 2002; 46(8): 1986-1996). Sin embargo, debido a la carencia de vasos sanguíneos distribuidos en el tejido del cartílago, el pequeño número de condrocitos que están altamente diferenciados, el pequeño número de células precursoras de cartílago, y el lento recambio de la matriz de cartílago, el cartílago tiene una capacidad de autorreproducción demasiado baja para asegurar la recuperación espontánea a partir de las disminuciones de la matriz articular del cartílago y de los condrocitos en la osteoartritis (Novartis Found. Symp. 2003; 249:2-16). Además, en la osteoartritis, la artritis se produce simultáneamente a la degeneración del cartílago, dando paso a dolor en la articulación (J Rheumatol 2001; 28(6): 1330-1337).

Los ejemplos de los agentes terapéuticos/profilácticos referidos para la artritis, tales como la artritis reumatoide y la osteoartritis, incluyen, por ejemplo, un inhibidor de la proteína tirosina quinasa (Publicación de la Patente Japonesa (Kohyo) Núm. 11-512708A (1999)), derivados de N-acil-2-glucosamina (Publicación de la Patente Japonesa (Kohyo) Núm. 2004-507490A), y derivados de quinolina/quinazolina (Publicación de la Patente Japonesa (Kokai) Núm. 9-169646A (1997)). Además, los agentes terapéuticos convencionales actuales para la osteoartritis que se han utilizado ampliamente son analgésicos antiinflamatorios orales o ácido hialurónico y preparaciones de esteroides adrenocorticales para inyección intra-articular, que alivian todos el dolor de la articulación, y esto significa que se requieren fármacos que tengan un efecto inhibidor de la degeneración del cartílago articular (Decision Base 7, 2002).

La guanil ciclasa (GC) es una proteína de membrana perteneciente a la familia de enzimas que cataliza la síntesis del segundo mensajero GMPc a partir de GTP, y los ejemplos incluyen GC-A, GC-B, ..., y GC-F. La GC-B se encuentra principalmente en las células endoteliales vasculares, y se cree que están implicadas en la relajación de la musculatura lisa. Se sabe que un péptido natriurético (NP) activa GC. Los NP se dividen en ANP (péptido natriurético atrial), BNP (péptido natriurético cerebral) y CNP (péptido natriurético tipo C), y se piensa que exhiben actividad biológica elevando el nivel de GMPc intracelular a través de dos receptores conjugados a guanil ciclasa (NPR-A para ANP y BNP, y NPR-B para CNP) (Ann Rev Biochem 1991; 60: 229-255).

El NPR-C no es un receptor conjugado a guanil ciclasa y se cree que es un receptor de aclaramiento para los NP no implicados en la transducción de la señal (Science, 1987; 238:675-678). Sin embargo, en un sistema por medio del cual se induce la producción de prostaglandina  $E_2$  ( $PGE_2$ ) por medio de la ciclooxygenasa 2 (COX-2) cuando se estimulan macrófagos de médula ósea de ratón con lipopolisacárido (LPS), se ha informado de que ANP y CNP muestran un efecto inhibidor sobre la producción de  $PGE_2$  disminuyendo los niveles de AMPc intracelular a través de NPR-C, y esto sugiere la implicación de NPR-C en la transducción de la señal de los NP (Endocrinology 2002; 143(3): 846-852). El informe describe que el ANP exhibe un efecto inhibidor de más de aproximadamente 70% sobre el aumento de la producción de  $PGE_2$  a través de la estimulación de los macrófagos de médula ósea de ratón (BMM) con LPS, mientras que el CNP exhibe solo un efecto inhibidor de hasta aproximadamente 20%, de este modo el CNP tiene un efecto más débil. Puesto que se sabe que el control de la producción de COX-2 a través de nucleótidos cíclicos tales como AMPc y GMPc, representa una reacción promotora o inhibidora dependiendo del tipo de célula o del tipo de estimulación, no está claro si la inhibición de la producción de  $PGE_2$  inducida por LPS en células BMM por CNP se puede aplicar a otras células y estimulaciones. Además, Endocrinology 2002; 143(3): 846-852 informó de que se demostró que el ANP exhibía un efecto inhibidor en un sistema en el que la administración de LPS aumentaba el nivel de tromboxano  $B_2$  ( $TXB_2$ ) en sangre en ratones, y por el contrario aumentaba cANF del mismo mecanismo. Además, aunque el informe describe la aplicación del ANP a enfermedades relacionadas con la inmunidad, tales como la artritis y la sepsis, no hace referencia a la aplicación de CNP a esas enfermedades relacionadas. En consecuencia, no se ha obtenido ningún descubrimiento concerniente a la acción del CNP sobre la artritis.

El documento JP-2003-113116, Yasato Komatsu et al. (Clinical Calcium 2003; 13(12):1578-1581) y Yasado Akihiko et al. (J. Biol. Chem. 1998; 273(19):11675-11700) describen que un activador de GC-B es eficaz en el tratamiento de la acondroplasia.

Se ha informado de que los NP desempeñan un papel importante en el control de la homeostasis humoral y la presión arterial (J Clin Invest 1987; 93:1911-1921, J Clin Invest 1994; 87: 1402-1412), y se conocen su expresión y actividad biológica en diversos tejidos distintos del sistema cardiovascular (Endocrinol 1991; 129:1104-1106, Ann Rev Biochem 1991; 60: 553-575). Para el cartílago, se ha informado sobre el uso de los CNP para la extensión de cartílago auxotónico y el tratamiento de la acondrogénesis en ratones transgénicos que expresan en exceso BNP (Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 1998; 95:2337-2342) o CNP (Nat Med 2004; 10 (1): 80-86, Publicación de Patente Japonesa (Kokai) Núm. 2003-113116A). Sin embargo, el cartílago de la placa de crecimiento es cartílago temporal que desaparece con el tiempo después de la calcificación y el desplazamiento por los huesos, y se sabe que tiene propiedades biológicas que son diferentes de cartílago permanente que existe durante toda la vida, tal como el

cartílago articular y el cartílago traqueal (Dev. Biol. 1989; 136 (2): 500-507, J Cell Biol. 2001; 153(1): 87-100). Además, aunque se ha informado sobre la actividad *in vitro* del CNP para mejorar la hipertrofia de los condrocitos articulares, que son cartílago permanente (J Biol Chem. 2003; 278 (21): 18824-18832), no ha obtenido ninguna conclusión con respecto a la acción *in vivo* sobre el cartílago articular en animales normales, o sobre la degeneración del cartílago articular o la artritis en la osteoartritis.

En la osteoartritis, el cartílago articular se hincha en la etapa más temprana de la enfermedad, lo que da como resultado un aumento temporal del volumen de tejido de cartílago (J Rheum 1991; 18(3): 1905-15), y con el progreso de la enfermedad, la degeneración/destrucción de la matriz de cartílago aumenta, lo que conduce a una disminución en el volumen (Arthritis Rheum 2004; 50(2): 476-487). El número de condrocitos articulares disminuye debido a la apoptosis (Arthritis Rheum 2004; 50(2): 507-515). Por otro lado, se sabe que los restantes condrocitos articulares individuales expresan colágeno de tipo X, y se diferencian en condrocitos hipertróficos que tienen la naturaleza de cartílago temporal (Arthritis Rheum 1992; 35(7): 806-811). Además, la artritis está acompañada de la destrucción del cartílago articular y puede ser un factor en el dolor clínico en la articulación afectada (J Rheumatol. 2001; 28(6): 1330-37). Se piensa que la inhibición de estos cambios en la osteoartritis, es decir las disminuciones en, o la recuperación de, matriz de cartílago articular y el número de condrocitos articulares, y la inhibición de la artritis, es útil en el desarrollo de agentes terapéuticos.

Un objeto de la descripción es proporcionar un nuevo agente terapéutico o profiláctico para la artritis, incluyendo la osteoartritis, o un método para el tratamiento de la artritis.

Otro objeto de la descripción es proporcionar un agente o método para promover el crecimiento de los condrocitos articulares.

Otro objeto de la descripción es proporcionar un método para inhibir la artritis, incluyendo la osteoartritis.

Otro objeto de la descripción es proporcionar un método para el escrutinio de un agente terapéutico para la artritis.

Otro objeto de la descripción es proporcionar un método para el escrutinio de un agente para promover el crecimiento de condrocitos articulares.

### **Compendio de la invención**

Se preparó un ratón transgénico que expresaba en exceso el péptido natriurético tipo C (CNP), que es un tipo de activador de la guanil ciclasa B (GC-B), para estudiar el efecto sobre el cartílago articular, y se obtuvieron los siguientes resultados: en el ratón transgénico para CNP, el grosor del cartílago articular y el número de condrocitos articulares aumentó significativamente; en un modelo de osteoartritis preparado a partir del ratón transgénico para CNP, éste era resistente a la hinchazón articular, con la degeneración del cartílago articular reducida, hubo ligeros cambios en el crecimiento de las células sinoviales, la granulación e infiltración de células inflamatorias, y el contenido de proteoglicanos en el cartílago articular no disminuyó, mientras que en un modelo de osteoartritis preparado a partir de un ratón normal, hubo cambios notables en el crecimiento de las células sinoviales, la granulación y la infiltración de células inflamatorias. A partir de estos hallazgos, se ha encontrado que el activador de GC-B posee un efecto anti-artritis, así como acción de asimilación sobre el cartílago articular.

Por lo tanto, la presente invención comprende lo siguiente:

- [1] Una composición farmacéutica que comprende un activador de la guanil ciclasa B (GC-B) para su uso en
  - (a) la inhibición de la artritis, en donde la artritis se inhibe mediante la activación de GC-B; o
  - (b) la inhibición de la degeneración del cartílago articular en la osteoartritis mediante el aumento del crecimiento de los condrocitos articulares, en donde dicho crecimiento se incrementa mediante la activación de GC-B,
 en donde el activador de GC-B es un péptido natriurético tipo C (CNP) o un derivado del mismo, en donde el CNP se selecciona del grupo que consiste en el CNP-22 del SEQ ID NO: 1 y el CNP-53 del SEQ ID NO: 2, y en donde el derivado se selecciona del grupo que consiste en un péptido activador de GC-B que tiene la secuencia de aminoácidos del SEQ ID NO: 1 en la que se sustituyen, suprimen, o añaden de 1 a 10 aminoácidos y que tiene una actividad de activación de GC-B y un péptido activador de GC-B que tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 2 en la que se sustituyen, suprimen, o añaden de 1 a 10 aminoácidos y que tiene una actividad de activación de GC-B.
- [2] El uso de un activador de la guanil ciclasa B (GC-B) para la preparación de una composición farmacéutica para
  - (a) la inhibición de la artritis, en donde la artritis se inhibe mediante la activación de GC-B; o
  - (b) la inhibición de la degeneración del cartílago articular en la osteoartritis aumentando el crecimiento de los condrocitos articulares, en donde dicho crecimiento se incrementa mediante la activación de GC-B,
 en donde el activador de GC-B es un péptido natriurético tipo C (CNP) o un derivado del mismo, en donde

el CNP se selecciona del grupo que consiste en el CNP-22 del SEQ ID NO: 1 y el CNP-53 del SEQ ID NO: 2, y en donde el derivado se selecciona del grupo que consiste de un péptido activador de GC-B que tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 1 en la que se sustituyen, suprimen, o añaden de 1 a 10 aminoácidos y que tiene una actividad de activación de GC-B y un péptido de activación de GC-B que tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 2 en la que se sustituyen, suprimen, o añaden de 1 a 10 aminoácidos y que tiene una actividad de activación de GC-B.

[3] La composición farmacéutica del apartado [1] o el uso del apartado [2], en donde el activador de GC-B es una combinación de un CNP o un derivado del mismo como se define en los apartados [1] o [2] y al menos un fármaco anti-inflamatorio no esteroideo .

[4] La composición farmacéutica o el uso del apartado [3], en donde el fármaco anti-inflamatorio no esteroideo es un inhibidor de la ciclooxigenasa.

[5] Una combinación de un activador de GC-B y un inhibidor de la ciclooxigenasa para su uso en la inhibición de la artritis, en donde la artritis es inhibida mediante la activación de GC-B y en donde el activador de GC-B es un péptido natriurético tipo C (CNP) o un derivado del mismo, en donde el CNP se selecciona del grupo que consiste en el CNP-22 de SEQ ID NO: 1 y el CNP-53 del SEQ ID NO: 2, y en donde el derivado se selecciona del grupo que consiste de un péptido activador de GC-B que tiene la secuencia de aminoácidos del SEQ ID NO: 1 en la que se sustituyen, eliminan, o añaden de 1 a 10 aminoácidos y que tiene una actividad de activación de GC-B y un péptido activador de GC-B que tiene la secuencia de aminoácidos del SEQ ID NO: 2 en la que se sustituyen, eliminan, o añaden de 1 a 10 aminoácidos y que tiene una actividad de activación de GC-B.

[6] La composición farmacéutica del apartado [4], el uso del apartado [4], o la combinación del apartado [5], en donde el inhibidor de la ciclooxigenasa se selecciona del grupo que consiste en indometacina, ibuprofeno, piroxicam, ácido salicílico, diclofenaco, cetoprofeno, y naproxeno.

[7] La composición farmacéutica de los apartados [1], [3], [4] o [6], el uso de uno cualquiera de los apartados [2] a [4] o [6], o la combinación de los apartados [5] o [6], en donde la artritis es la osteoartritis.

[8] El uso de la composición farmacéutica o la combinación del apartado [7], en donde la osteoartritis es la osteoartritis de las articulaciones que soportan peso o las articulaciones que no soportan peso.

[9] El uso de la composición farmacéutica o la combinación del apartado [8], en donde la artrosis es

- (a) gonartrosis degenerativa;
- (b) coxartrosis degenerativa; o
- (c) artrosis temporomandibular.

[10] La composición farmacéutica de los apartados [1], [3], [4] o [6], el uso de uno cualquiera de los apartados [2] a [4] o [6], o la combinación de los apartados [5] o [6], en donde la artritis está causada por

- (a) artritis reumatoide; o
- (b) osteoartritis.

[11] Un método para el escrutinio de un promotor del crecimiento de los condrocitos articulares, que comprende

- (a) la preparación de células cultivadas que expresan GC-B o células de condrocitos articulares;
- (b) el cultivo de las células en presencia de un agente candidato; y
- (c) el escrutinio de los agentes candidatos para determinar la capacidad de promover el crecimiento de condrocitos articulares utilizando como indicación la diferencia entre la actividad de GC-B celular en presencia y ausencia del agente candidato.

[12] El método del apartado [11], en donde la actividad de GC-B se determina como una cantidad de GMPc intracelular producido.

[13] Un método de escrutinio de un promotor del crecimiento de los condrocitos articulares que comprende

- (a) la preparación de una línea celular cultivada que ha sido forzada a expresar GC-B
- (b) el cultivo de la línea celular en presencia o ausencia de un agente candidato;
- (c) la determinación de la cantidad de GMPc intracelular producido; y
- (d) el escrutinio de los agentes candidatos para determinar la capacidad de promover el crecimiento de condrocitos articulares utilizando como indicación la diferencia entre las cantidades de GMPc intracelular producido en presencia y ausencia del agente candidato.

[14] Un método para el escrutinio de un agente terapéutico para la osteoartritis, la artritis reumatoide u otras artritis que comprende

- (a) la preparación de células cultivadas que expresan GC-B, o células de condrocitos articulares;
- (b) el cultivo de las células en presencia de un agente candidato; y
- (c) el escrutinio de agentes candidatos a un agente capaz de tratar la osteoartritis, la artritis reumatoide u otra artritis utilizando como indicación la diferencia entre la actividad de GC-B celular en presencia y ausencia del agente candidato.

[15] El método del apartado [14], en donde la actividad de GC-B se determina como una cantidad de GMPc intracelular producido.

[16] Un método para el escrutinio de un agente terapéutico para la osteoartritis, la artritis reumatoide u otra artritis que comprende

- (a) la preparación de una línea celular cultivada que ha sido forzada a expresar GC-B;
- (b) el cultivo de la línea celular en presencia o ausencia de un agente candidato;
- (c) la determinación de la cantidad de GMPc intracelular producido; y
- (d) el escrutinio de agentes candidatos a un agente capaz de tratar la osteoartritis, la artritis reumatoide u

otra artritis utilizando como indicación la diferencia entre las cantidades de GMPc intracelular producido en presencia y ausencia del agente candidato.

### Breve Descripción de los Dibujos

La Fig. 1 muestra la construcción de un vector para la preparación de un ratón transgénico para CNP. Fig. 1A: El ADNc del ratón CNP, que se ha incorporado al vector pGEM-T Easy, se cortó con Pst I y se formaron extremos romos en cada extremo. Fig. 1B: El pSG1 se trató con EcoRI y se formaron extremos romos. Fig. 1C: El ADNc de ratón CNP preparado en la Fig. 1A se incorporó al pSG1 obtenido en la Fig. 1B.

La Fig. 2 muestra un fragmento de ADN para inyección. Un fragmento (aproximadamente 2,3 kb) que contenía el gen CNP se cortó desde pSG1-CNP preparado en la Fig. 1C mediante digestión con Hind III y Xho I, y se utilizó como un fragmento para su inyección.

La Fig. 3 muestra los resultados de un análisis genotípico de un ratón transgénico para CNP. En el ratón de tipo salvaje (WT) se detectaron 3 señales (indicadas como "gen CNP de tipo salvaje"), mientras que en el ratón transgénico (Tgm) se detectaron 2 señales (indicadas como "Transgenes") derivadas del transgén, además del gen CNP de tipo salvaje.

La Figura 4 es un gráfico que muestra engrosamiento del cartílago articular en un ratón transgénico para CNP. El espesor del cartílago articular de la facies patellaris femoris se comparó entre una camada normal (Salvaje) y ratones transgénicos para CNP (CNP tgm). La figura indica que los ratones transgénicos para CNP tienen estadísticamente cartílago articular significativamente más grueso. \*\*:  $p < 0,01$ , prueba t de Student para datos independientes.

La Figura 5 es un gráfico que muestra un aumento en el número de condrocitos articulares en un ratón transgénico para CNP. El número de condrocitos por campo bajo el microscopio óptico en el cartílago articular de la facies patellaris femoral se comparó entre una camada normal (Salvaje) y ratones transgénicos para CNP (CNP tgm). La figura indica que los ratones transgénicos para CNP tienen estadísticamente un número significativamente mayor de condrocitos por campo microscópico. \*:  $p < 0,05$ , prueba t de Student para datos independientes.

La Figura 6 es un gráfico que muestra la resistencia a la hinchazón articular en un modelo de OA inducida por colagenasa en ratones transgénicos para CNP. Después de la administración de colagenasa al 3% o solución salina fisiológica a un ratón transgénico para CNP (Tgm) y un ratón de tipo salvaje (WT) a la articulación de la rodilla derecha, se midió la anchura de las articulaciones de rodilla bilaterales y se utilizó la diferencia en la anchura como indicación para la hinchazón de la articulación de la rodilla para evaluar el progreso (Figura 6A) y el área bajo la curva (AUC) (Figura 6B). El ratón transgénico para CNP tendía a tener hinchazón débil en la articulación de la rodilla derecha, y tenía un AUC significativamente menor que en el tipo salvaje. \*\*:  $p < 0,01$ , NS: no significativo. Prueba t de Student para datos independientes.

La Figura 7 muestra los cambios histológicos en la membrana sinovial articular de la rodilla derecha en un modelo de OA inducida por colagenasa. Es una imagen histológica de la membrana sinovial articular de la rodilla derecha 28 días después de la administración de solución salina fisiológica de colagenasa al 3% a un ratón transgénico para CNP y un ratón de tipo salvaje en la articulación de la rodilla derecha. Cuando se administró colagenasa al 3%, el ratón de tipo salvaje mostró hiperplasia de las células epiteliales sinoviales, granulación e infiltración de células inflamatorias (Figura 7B). Por otra parte, estos resultados eran muy escasos en los ratones transgénicos para CNP (Figura 7C). La Figura 7A es una vista de tejido sinovial normal.

La Figura 8 muestra los cambios histológicos en el cartílago articular del cóndilo femoral medial derecho en un modelo de OA inducida por colagenasa. Se trata de una imagen histológica del cóndilo femoral medial derecho 28 días después de la administración de solución salina fisiológica de colagenasa al 3% en la articulación de la rodilla derecha de un ratón transgénico para CNP y un ratón de tipo salvaje. La capacidad de tinción de safranina O de la matriz del cartílago disminuyó mostrando la disminución del contenido de proteoglicanos en el ratón de tipo salvaje (Figura 8B), mientras que la capacidad de tinción de safranina O fue retenida en el ratón transgénico para CNP (Figura 8C). La Figura 8A es una vista del cartílago articular normal.

La Figura 9 es un gráfico que muestra la eficacia en la inhibición de la hinchazón articular en un modelo de ratón CNP con OA inducida por colagenasa que recibe infusión. El gráfico muestra la hinchazón de la articulación de la rodilla derecha según se mide 6 días después de la administración de colagenasa al 1,5% que contiene solución salina fisiológica en la articulación de la rodilla derecha de un ratón J Jcl C57BL/6 que recibe la administración subcutánea continua de CNP-22. CNP-22, tanto a 60 como a 600 ng/día, inhibió significativamente la hinchazón de la articulación de la rodilla derecha en comparación con el grupo control de disolvente (vehículo). Prueba t de Student para datos independientes.

La Figura 10 es un gráfico que muestra la eficacia de la infusión de CNP en la inhibición de la hinchazón articular en un modelo de ratón con OA quirúrgica. A un ratón C57BL/6 J JCL se le proporcionó administración subcutánea continua de CNP-22 y se sometió a los procedimientos quirúrgicos de escisión del ligamento anterocrucial, escisión del ligamento colateral tibial y resección total del menisco medial de la articulación de la rodilla derecha para inducir la osteoartritis. La anchura de las articulaciones de la rodilla derecha e izquierda se midió 4, 8 y 11 días después de la operación, y se mostró el AUC de la diferencia. El CNP-22, tanto a 60 como a 600 ng/día, inhibió significativamente la hinchazón de la articulación de la rodilla derecha en comparación con el grupo control de disolvente (vehículo). Prueba t de Student para datos independientes.

La Figura 11 es un gráfico que muestra el efecto inhibidor de CNP-22 (6 ng/día, administración subcutánea continua), indometacina (Indo., 1 mg/kg, administración oral) y una combinación de los mismos en la hinchazón de la articulación de la rodilla en un modelo de ratón C57BL/6 J Jcl de OA inducida por colagenasa. La figura 11A muestra los cambios en la hinchazón de la articulación de la rodilla derecha más de siete días después de la administración de solución salina fisiológica de colagenasa al 0,15% y 1,5% en la articulación de la rodilla derecha del ratón. La Figura 11B muestra el área bajo la curva (AUC) del gráfico de la Figura 11A. Cuando se comparó la AUC, CNP-22 inhibió significativamente la hinchazón de la articulación de la rodilla derecha en comparación con el grupo de control de disolvente (vehículo) mientras que la indometacina no lo hizo. Por otra parte, una combinación de CNP-22 e indometacina mostró una inhibición notable, que fue significativamente más fuerte que cuando se utilizó CNP-22 solo. Prueba t de Student para datos independientes. \*:  $p < 0,05$  (frente a vehículo), \*\*:  $p < 0,01$  (frente a vehículo).

La Figura 12 es un gráfico que muestra la eficacia de CNP-22 para la artritis en los extremos de las extremidades y el cambio de peso corporal en un modelo de rata de artritis inducida por adyuvante. La Figura 12A representa los cambios en la puntuación de la artritis de los extremos de las extremidades, e indica las menores puntuaciones de artritis para el grupo de CNP-22. La figura 12B representa los cambios de peso corporal, e indica que en los días 7 y 10 desde la sensibilización con antígeno, el grupo CNP-22 mostró pesos corporales significativamente pesados en comparación con el grupo de control de disolvente (vehículo). Prueba t de Student para datos independientes. \*:  $p < 0,05$  (frente a vehículo).

La Figura 13 es un gráfico que muestra el efecto de CNP-22 sobre el peso corporal en un modelo de rata de artritis inducida por colágeno. Se indica que mientras que en los días 21, 24 y 28 desde la sensibilización con antígeno, el grupo de control de disolvente (vehículo) mostró un peso corporal significativamente ligero en comparación con el grupo normal, el grupo (CNP 6 µg/día) de CNP-22 mostró un peso corporal significativamente pesado en comparación con el grupo de control de disolvente. Prueba t de Student para datos independientes. ###:  $p < 0,01$  (frente a normal), \*:  $p < 0,05$  (frente a vehículo).

### Descripción detallada de la invención

La invención se describe adicionalmente con referencia a las figuras.

El genotipo de un ratón transgénico para CNP (CNP Tgm) producido como se describe más adelante en el Ejemplo 2 se analizó utilizando transferencia de Southern. Como resultado, se detectaron 3 señales ("gen CNP de tipo salvaje") en el ratón de tipo salvaje, mientras que se detectaron 2 señales ("Transgén") derivadas del transgén en el CNP Tgm además del gen CNP de tipo salvaje, como se muestra en la Fig. 3. Se determinaron los niveles de CNP en el hígado, un órgano en el que espera que se exprese altamente dicho transgén, y en el plasma sanguíneo con el fin de estudiar la expresión de CNP en el CNP Tgm. Como resultado, se encontró que el CNP Tgm mostró niveles de CNP aproximadamente 10 veces y aproximadamente 24 veces más altos en el hígado y el plasma sanguíneo, respectivamente, que el tipo salvaje, lo que demuestra la expresión en exceso estadísticamente significativa de péptidos CNP (Tabla 1 en el Ejemplo 4).

Además, se examinaron histológicamente el grosor del cartílago articular y el número de condrocitos para llevar a cabo un análisis histológico de cartílago articular del CNPTgm, y los resultados indicaron que el cartílago articular fue estadísticamente significativamente grueso (Figura 4) y el número de condrocitos articulares fue estadística y significativamente grande (Figura 5) en el CNPTgm. Estos resultados mostraron que activadores de GC-B tales como CNP pueden aumentar el grosor del cartílago articular al aumentar el número de condrocitos.

En el Ejemplo 6 descrito más adelante, se creó un modelo animal con osteoartritis mediante la inyección de colagenasa en la articulación de la rodilla de un ratón para desestabilizar el ligamento de la articulación de la rodilla y el menisco e inducir osteoartritis (Am. J. Pathol. 1989; 135:1001-14). Se utilizaron modelos animales osteoarthríticos derivados de CNPTgm y un ratón normal para evaluar la resistencia del CNPTgm a la artritis y la degeneración del cartílago articular. En el modelo animal derivado del CNPTgm, en comparación con el modelo animal derivado de un ratón normal, la hinchazón de la articulación de rodilla fue significativamente más suave, la degeneración del cartílago articular se inhibió en un grado significativamente mayor, los cambios en el crecimiento de células

sinoviales, la granulación y la infiltración de células inflamatoria en la membrana sinovial fueron bastante ligeros, y no hubo casi ningún cambio en 13 el contenido de proteoglicanos en el cartílago articular (Figuras 6-8). Estos resultados indicaron que los activadores de GC-B tienen un efecto inhibidor sobre la artritis y la degeneración del cartílago articular en la osteoartritis.

Además, se creó un modelo de osteoartritis utilizando un ratón normal trasplantado con una bomba osmótica para examinar el efecto terapéutico de la infusión de CNP en el modelo de osteoartritis. En el grupo de CNP, se encontró que los animales eran resistentes a la hinchazón de la articulación de la rodilla, tenían una degeneración reducida significativamente del cartílago articular, y mostraban cambios muy leves en el crecimiento celular sinovial, la granulación y la infiltración de células inflamatorias en la membrana sinovial (Figura 9). Estos resultados indicaron que los activadores de GC-B tienen un efecto terapéutico sobre la osteoartritis.

Por otra parte, un ratón normal trasplantado con una bomba osmótica se sometió a los procedimientos quirúrgicos de corte del ligamento anterocrucial, corte del ligamento colateral tibial y resección total del menisco medial de la articulación de la rodilla derecha para inducir la osteoartritis, y se examinó el efecto terapéutico de la infusión de CNP en el modelo de osteoartritis. Los resultados mostraron que el AUC (área bajo la curva) fue significativamente menor en el grupo de CNP a cualquiera de las dosis en comparación con el grupo control de disolvente (Figura 10). Los resultados indicaron que los activadores de GC-B también son eficaces en la inhibición de la artritis en la osteoartritis inducida por sobrecarga física que resulta de procedimientos quirúrgicos.

Además, cuando el CNP se administró a un modelo de ratón de OA inducida por colagenasa, ya sea solo o combinado con un fármaco anti-inflamatorio no esteroideo (AINE), el CNP utilizado solo inhibió significativamente la hinchazón de las articulaciones de la rodilla, mientras que no lo hizo el AINE utilizado solo, y la combinación de CNP y AINE mostró un efecto anti-inflamación sinérgico aún más fuerte (Ejemplo 9, Figura 11).

Además, cuando se examinó adicionalmente el efecto de CNP utilizando modelos de artritis inducida por adyuvante y artritis inducida por colágeno utilizados generalmente en los laboratorios como modelo de artritis reumatoide (AR) (Arthritis & Rheumatism, 27:797-806, 1984; British Journal of Rheumatology, 33:798-807, 1994), el grupo CNP (rata) mostró artritis significativamente reducida y un aumento de peso mayor en comparación con el control, lo que indica una mejora significativa del estado general (Ejemplos 10 y 11 y Figuras 12 y 13). Estos resultados muestran la eficacia de CNP para la artritis en la artritis reumatoide.

A partir de estos ejemplos demostrativos, se encontró que activadores de GC-B tales como CNP poseen un efecto anti-artritis, así una acción asimiladora en el cartílago articular.

Por lo tanto, en la presente memoria se describe un agente terapéutico o profiláctico para la artritis que comprende un activador de GC-B como ingrediente activo.

Los ejemplos de artritis que pueden ser tratadas o prevenidas incluyen aquellas que implican cartílago articular en particular, tales como la artritis asociada con la osteoartritis, la sinovitis, la artritis reumatoide (artritis reumatoide (adultos) y la artritis reumatoide juvenil (niños)), la osteoartritis, el lupus eritematoso generalizado (LEG), la gota, la esclerodermia, la psoriasis (artritis psoriásica), la infección micótica tal como la blastomicosis, la espondilitis anquilosante, el síndrome de Reiter, la artritis séptica, la enfermedad de Still del adulto, la enfermedad de Lyme terciaria (última etapa), la tuberculosis (artritis tuberculosa), la infección viral (artritis viral), y la artritis causada por la infección con gonorrea (artritis gonocócica) y bacteriana (artritis bacteriana no gonocócica).

En una realización descrita en la presente memoria, una artritis preferida es la osteoartritis, o la artritis asociada con la osteoartritis.

La osteoartritis es una enfermedad causada por la degeneración y la destrucción del cartílago articular, y los ejemplos de la osteoartritis aplicable incluyen, por ejemplo, (1) la osteoartritis de las articulaciones que soportan peso, tales como la gonartrosis en la articulación de la rodilla, la coxartrosis en la articulación de la cadera, la osteoartritis de los pies en el pie y la osteoartritis espinal en la columna vertebral, y (2) la osteoartritis de las articulaciones que no soportan peso, tal como la osteoartritis del hombro en el hombro, osteoartritis del codo en el codo, la osteoartritis de la mano en la mano (por ejemplo, nódulos de Heberden, nodulos de Bouchard, la osteoartritis CM del pulgar) y la artrosis temporomandibular en la mandíbula.

En una realización descrita en este documento, la osteoartritis es la osteoartritis afecta a las articulaciones que soportan peso, preferiblemente gonartrosis o coxartrosis.

En otra realización descrita en la presente memoria, la osteoartritis es la osteoartritis que afecta a las articulaciones que no soportan peso, preferentemente artrosis temporomandibular.

Los agentes terapéuticos o profilácticos descritos en la presente memoria también se pueden aplicar en el

tratamiento o la prevención de la artritis reumatoide. Se cree que la artritis reumatoide es una enfermedad autoinmunitaria, y aunque tiene diferente etiología de la osteoartritis, implica, como con la osteoartritis, la degeneración de las superficies del cartílago articular y la destrucción de cartílago a medida que avanza. En consecuencia, los agentes terapéuticos descritos en la presente memoria se pueden administrar para inhibir o aliviar la artritis.

Los términos "tratamiento", "método de tratamiento" y "agente terapéutico", según se utiliza en la presente memoria, significa eliminar, inhibir o aliviar los síntomas de un paciente con artritis de acuerdo con la presente invención, o métodos o fármacos para ese propósito. Además, los términos "prevención" y "agente profiláctico" significan prevenir la artritis o los fármacos para ese propósito.

Según se utiliza en la presente memoria, el término "guanil ciclasa B (GC-B)" tiene el mismo significado que el receptor del péptido natriurético B (NPR-B).

Según se utiliza en la presente memoria, el término "actividad de GC-B" tiene el mismo significado que actividad de la guanil ciclasa. En la descripción, un activador de la guanil ciclasa B (GC-B) o un activador de GC-B es un péptido o un compuesto de bajo peso molecular no peptídico, preferiblemente un péptido CNP o un derivado del mismo, que puede unirse a, y activar, GC-B, que es conocido como receptor de CNP. Los péptidos utilizados en la presente memoria se refieren a una sustancia que consiste en conexiones mediante enlaces amida de una pluralidad de aminoácidos (L-, D- y/o modificados), e incluyen polipéptidos y proteínas. Un activador de GC-B se puede identificar, por ejemplo, mediante la expresión de un receptor de GC-B en una línea de células cultivadas tales como células COS-7, la adición de un agente candidato al medio, el cultivo de la línea celular durante un cierto período de tiempo a una cierta temperatura (por ejemplo, 37°C, 5 minutos), y la medición de la cantidad de GMPc intracelular producido (Science 1991, 252: 120-123). Utilizando un sistema de análisis de este tipo, y utilizando la cantidad de producción de GMPc intracelular como indicación, se puede identificar y utilizar un activador de GC-B en la presente invención.

De acuerdo con una realización descrita en la presente memoria, el activador de GC-B es un péptido, y preferiblemente CNP o un derivado del mismo. El CNP preferido se selecciona entre CNP-22 y CNP-53 de mamíferos, incluyendo seres humanos, o aves, y más preferiblemente CNP-22 del SEQ ID NO: 1 o CNP-53 del SEQ ID NO: 2.

De acuerdo con otra realización descrita en la presente memoria, el derivado de CNP descrito anteriormente tiene una delección, sustitución o adición de uno o varios aminoácidos en la secuencia de aminoácidos del SEQ ID NO: 1 o SEQ ID NO: 2, si bien posee actividad de CNP. Alternativamente, el derivado de CNP comprende una secuencia que tiene aproximadamente 70% o más, aproximadamente 80% o más, aproximadamente 85% o más, aproximadamente 90% o más, aproximadamente 95% o más, aproximadamente 97% o más, aproximadamente 98% o más, o alrededor de 99% o más identidad con la secuencia de aminoácidos del SEQ ID NO: 1 o SEQ ID NO: 2 y conserva la actividad de CNP.

El término "uno o varios" según se utiliza en la presente memoria generalmente representa cualquier número entero entre 1 y 10, preferiblemente entre 1 y 5, más preferiblemente entre 1 y 3. El "% de identidad" entre dos secuencias de aminoácidos puede determinarse utilizando mecanismos bien conocidos por los expertos en la técnica, tal como la búsqueda de proteínas BLAST (Altschul, S.F., Gish, W. Miller, W., Myers, E.W. y Lipman, D.J. (1990) "Basic Local Alignment Search Tool" J. Mol. Biol. 215:403-410).

Los ejemplos de los CNP utilizables en la presente memoria incluyen CNP de mamíferos incluidos seres humanos (CNP-22: Biochem. Biophys. Res. Commun. 1990; 168: 863-870, Publicación Internacional Núm. WO 91/16342, CNP-53: Biochem. Biophys. Res. Commun. 1990; 170:973-979, Publicación de Patente Japonesa (Kokai) Núm. 4-74198A (1992), Publicación de Patente Japonesa (Kokai) Núm. 4-139199A (1992), Publicación de Patente Japonesa (Kokai) Núm. 4-121190A (1992)), CNP de aves (Publicación de Patente Japonesa (Kokai) Núm. 4-120094A (1992)), CNP de anfibios (Publicación de Patente Japonesa (Kokai) Núm. 4-120095A (1992)), y derivados de CNP tales como péptidos análogos de CNP descritos en la Publicación de Patente Japonesa (Kokai) Núm. 6-9688A (1994) y Publicación Internacional Núm. WO 02/074234.

CNP-22 y CNP-53, que consisten en 22 y 53 residuos de aminoácidos, respectivamente, son conocidos como CNP de origen natural. Debido a que los CNP tienen una alta homología en sus secuencias entre las aves y los mamíferos, incluyendo seres humanos, es decir, independientemente de la clase de animales, en la presente invención se pueden utilizar CNP de aves y mamíferos, incluyendo seres humanos, preferiblemente CNP de mamíferos incluyendo seres humanos, y más preferiblemente CNP de seres humanos. La secuencia de aminoácidos de CNP-22 o CNP-53 humanos tienen la secuencia mostrada en el SEQ ID NO: 1 o SEQ ID NO: 2, respectivamente, representado por:

Gly Leu Ser Lys Gly Cys Phe Gly Leu Lys Asp Leu Arg Ile Gly Ser Met Ser Gly Leu Gly Cys (CNP-22 humano; SEQ ID NO: 1); o  
Asp Leu Arg Val Asp Thr Ser Lys Arg Ala Ala Ala Trp Arg Leu Leu Gln Glu Ser Pro Asn Ala Arg Lys Tyr Lys Gly Ala

Asn Lys Lys Gly Leu Ser Lys Gly Cys Phe Gly Leu Lys Leu Asp Arg Ile Gly Ser Met Ser Gly Leu Gly Cys (CNP-53 humana; SEQ ID NO: 2), cada uno de los cuales tiene un enlace disulfuro intramolecular, es decir, entre 6-Cys y 22-Cys en el CNP-22 humano o entre 37-Cys y 53-Cys en el CNP-53 humano, formando una estructura de péptido cíclico.

El CNP-22 de cerdo y CNP-22 de rata tienen la misma secuencia de aminoácidos que el CNP-22 humano, mientras que los residuos de aminoácidos en las posiciones 17 y 28 son His y Gly, respectivamente, en CNP-53 de cerdo y CNP-53 de rata, y son Gin y Ala en CNP-53 humano, es decir, dos aminoácidos son diferentes en CNP-53 entre seres humano y cerdo o rata (Publicación de Patente Japonesa (Kokai) Núm. 4-139199A (1992), Publicación de Patente Japonesa (Kokai) Núm. 4-121190A (1992), y Publicación de Patente Japonesa (Kokai) Núm. 4-74198A (1992)). Además, el CNP-22 de pollo tiene la misma estructura primaria que CNP-22 humano, con la excepción de que el residuo de aminoácido en la posición 9 es Val (Publicación de Patente Japonesa (Kokai) Núm. 4-120094A (1992)).

Los CNP utilizables en la presente memoria incluyen los CNP purificados a partir de fuentes naturales, los CNP recombinantes producidos por técnicas de ingeniería genética conocidas, y los CNP producidos por síntesis químicas conocidas (por ejemplo, una síntesis en fase sólida utilizando un sintetizador de péptidos), preferiblemente CNP-22 humano y CNP-53 humano producidos por medio de técnicas de ingeniería genética. La producción de CNP humano por medio de técnicas de ingeniería genética comprende, por ejemplo, las etapas de incorporación de la secuencia de ADN humano de CNP-22 o de CNP-53 (Publicación de Patente Japonesa Núm. 4-139199A (1992)) en un vector tal como un plásmido o fago, transformación del vector en una célula anfitriona procariota o eucariota, tal como E. coli o levadura, y expresión del ADN en un medio de cultivo adecuado, preferiblemente permitiendo que las células secreten el péptido CNP extracelularmente, y recogiendo y purificando el péptido CNP producido. La reacción en cadena de la polimerasa (PCR) también se puede utilizar para amplificar el ADN diana.

Las técnicas básicas tales como la recombinación genética, la mutagénesis dirigida al sitio y las técnicas de PCR son bien conocidas por los expertos en la técnica, que son descritas, por ejemplo, por J. Sambrook y col., en Molecular Cloning, A Laboratory Manual, Segunda Edición, Cold Spring Harbor Laboratory Press (1990); Ausubel et al., Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons (1998), y dichas técnicas descritas aquí se pueden utilizar para la presente invención. En cuanto a los vectores, también se pueden utilizar vectores disponibles en el mercado o vectores descritos en las publicaciones.

Los derivados de CNP que se pueden utilizar en la presente memoria tienen la actividad de CNP y tienen una estructura de péptido cíclico que tiene un enlace disulfuro entre dos residuos de cisteína como se observa en el CNP-22 o CNP-53 humanos. Los ejemplos de los derivados de CNP incluyen: fragmentos de los CNP como los descritos anteriormente; péptidos que tienen una sustitución de al menos un aminoácido por otro aminoácido en los CNP anteriores o fragmentos de los mismos; péptidos que tienen una delección de al menos un aminoácido en los CNP anteriores o péptidos parciales de los mismos; y péptidos que tienen una adición de al menos un aminoácido en los CNP anteriores o péptidos parciales de los mismos. Según se utiliza en la presente memoria, la sustitución, delección o adición de aminoácidos significa que un cierto número de aminoácidos son sustituidos, suprimidos o añadidos por medio de un método bien conocido tal como la mutagénesis dirigida al sitio, con la condición de que no se pierda la actividad de los CNP. Por ejemplo, los derivados de CNP-22 o CNP-53 tienen una sustitución, delección o adición de uno a 10 aminoácidos en la secuencia de aminoácidos del SEQ ID NO: 1 o SEQ ID NO: 2, que posee la actividad de los CNP.

En general, la sustitución de aminoácidos es preferiblemente una sustitución entre aminoácidos conservativos. Los aminoácidos conservativos se pueden clasificar de acuerdo, por ejemplo, con la polaridad (o carácter hidrófobo) o tipos de cargas eléctricas. Los ejemplos de aminoácidos no cargados, no polares incluyen glicina, alanina, valina, leucina, isoleucina, prolina, etc.; los aminoácidos aromáticos incluyen fenilalanina, tirosina y triptófano; los aminoácidos no cargados polares incluyen serina, treonina, cisteína, metionina, asparragina, glutamina, etc.; los aminoácidos cargados negativamente incluyen ácido aspártico y ácido glutámico; y los aminoácidos cargados positivamente incluyen lisina, arginina e histidina.

La actividad de CNP en la presente memoria se refiere a la actividad para actuar sobre GC-B para aumentar la actividad de la guanil ciclase, la actividad para eliminar, inhibir o aliviar la artritis, incluyendo la osteoartritis, y la actividad para promover el crecimiento del cartílago articular. La actividad de CNP se puede determinar midiendo la actividad de la guanil ciclase celular, tal como, por ejemplo, la producción intracelular de GMPC, y/o administrando un CNP o un derivado del mismo durante un determinado período a modelos de artritis, osteoartritis o artritis reumatoide de ratón o rata, y midiendo tal como se describe más adelante en los Ejemplos 7 a 10 la eficacia en la inhibición de la artritis o de la degeneración del cartílago articular.

Los ejemplos de los péptidos análogos de CNP-22 incluyen los siguientes péptidos cíclicos descritos en la Publicación de Patente Japonesa (Kokai) Núm. 6-9688 (1994) y la Publicación Internacional Núm. WO 02/074234 Gly Leu Ser Lys Gly Cys Phe Gly Leu Lys Leu Asp Arg Ile Gly Ala Met Ser Gly Leu Gly Cys (SEQ ID NO: 3)

Gly Leu Ser Lys Gly Cys Phe Gly Leu Lys Leu Asp Arg Ile Gly Ser Gln Ser Gly Leu Gly Cys (SEQ ID NO: 4)  
 Gly Leu Ser Lys Gly Cys Phe Gly Leu Lys Leu Asp Arg Ile Gly Ser Ala Ser Gly Leu Gly Cys (SEQ ID NO: 5)  
 Cys Phe Gly Leu Lys Asp Leu Arg Ile Gly Ser Met Ser Gly Leu Gly Cys (SEQ ID NO: 6)

**Ser Leu Arg Arg Ser Ser Cys Phe Gly Leu Lys Leu Asp Arg Ile Gly Ser Met Ser Gly Leu Gly**

**Cys (SEQ ID NO:7)**

**Gly Leu Ser Lys Gly Cys Phe Gly Leu Lys Leu Asp Arg Ile Gly Ser Met Ser Gly Leu Gly Cys**

**Asn Ser Phe Arg Tyr (SEQ ID NO:8)**

Cys Phe Gly Leu Lys Leu Asp Arg Ile Gly Ser Gln Ser Gly Leu Gly Cys Asn Ser Phe Arg Tyr (SEQ ID NO: 9)

Cys Phe Gly Xaa Xbb Xcc Asp Arg Ile Gly Xdd Xee Ser Xff XGG Gly Cys

(en donde Xaa = Leu, Ile, Val; Xbb = Lys, Leu, Met; Xcc = Leu, Ile, Ala, Val; Xdd = Ser, Ala, Gly, Thr, Asn; Xee = Met, Ala, Trp, His, Lys, Ser, Gly; Xff = Gly, Lys, Ala, Leu; Xgg = Leu, met) (SEQ ID NO: 10).

Además, los péptidos análogos de CNP-53 incluyen péptidos cíclicos que contienen variaciones similares de aminoácidos que corresponden a los péptidos análogos de CNP-22 descritos anteriormente.

La presente invención también proporciona un agente para promover el crecimiento de los condrocitos articulares, que comprende un activador de GC-B como ingrediente activo. Esta descripción se basa en la acción de un activador de GC-B para aumentar los condrocitos articulares. Los ejemplos del activador de GC-B son los CNP como se ha definido anteriormente, o derivados de los mismos. El CNP es preferiblemente CNP-22 o CNP-53 de mamífero, incluyendo ser humano, o aves, más preferiblemente CNP-22 del SEQ ID NO: 1 o CNP-53 del SEQ ID NO: 2. El derivado de CNP tiene una delección, sustitución o adición de uno o varios aminoácidos en la secuencia de aminoácidos del SEQ ID NO: 1 o SEQ ID NO: 2, y tiene actividad de CNP. Otros activadores de GC-B se pueden identificar, por ejemplo, mediante la expresión de un receptor de GC-B en células cultivadas tales como células COS-7, la adición de un agente candidato para el medio, el cultivo de las células durante un cierto período de tiempo a una cierta temperatura (por ejemplo, 37°C, 5 minutos), y la medición de la cantidad de GMPc intracelular producido (Science 1991; 252: 120-123). Utilizando tal sistema de análisis y utilizando la cantidad de GMPc intracelular producido como indicación, se puede identificar y utilizar en la presente memoria un activador de GC-B.

También se describe en la presente memoria un método para inhibir la artritis, en donde la artritis se inhibe mediante la activación de GC-B. También se describe en la presente memoria un método para promover el crecimiento de los condrocitos articulares que comprende la promoción del crecimiento mediante la activación de GC-B.

Estos métodos se basan en el hallazgo de que se puede inhibir la artritis como se definió anteriormente, preferiblemente la osteoartritis, y se puede mejorar el crecimiento de los condrocitos articulares mediante el uso de un activador de GC-B, o mediante la activación de GC-B. En una realización descrita en la presente memoria la GC-B es activada por el CNP como se definió anteriormente o derivados de los mismos.

También se describe en la presente memoria un método para el escrutinio de un agente para promover el crecimiento de condrocitos articulares, que comprende el escrutinio de agentes candidatos para determinar la capacidad de promover el crecimiento de los condrocitos articulares mediante la actividad de GC-B como indicación. Puesto que la GC-B es conocida por catalizar la síntesis del segundo mensajero GMPc a partir de GTP a través de la actividad de la guanil ciclasa, la actividad de GC-B puede ser determinada como la cantidad de GMPc intracelular producido.

De acuerdo con una realización descrita en la presente memoria, el método de escrutinio como se ha descrito anteriormente puede incluir las etapas de preparación de las células que expresan GC-B, o células derivadas de condrocitos articulares, cultivo de las células en presencia de un agente candidato, y detección del agente candidato para determinar la capacidad para promover el crecimiento de los condrocitos articulares mediante la actividad de la guanil ciclasa celular, por ejemplo la cantidad de GMPc intracelular producido, como indicación.

De acuerdo con una realización preferida descrita en la presente memoria, el método de escrutinio comprende la preparación de una línea celular cultivada que había sido forzada a expresar GC-B, el cultivo de la línea celular en presencia o ausencia de un agente candidato, la determinación de la cantidad de GMPc intracelular producido, y la detección del agente candidato para determinar la capacidad para promover el crecimiento de condrocitos articulares utilizando como indicación la diferencia entre las cantidades de GMPc intracelular producido en presencia y ausencia del agente candidato.

El método de escrutinio descrito en la presente memoria puede ser utilizado para escrutar un promotor del crecimiento de los condrocitos articulares, por ejemplo, expresando GC-B en células cultivadas tales como células COS-7, añadiendo un agente candidato para el medio, cultivando las células durante un cierto período de tiempo a una cierta temperatura (por ejemplo, 37°C, 5 minutos), y la determinando la cantidad de GMPc intracelular producido

(Science 1991; 252: 120-123).

También se describe en la presente memoria un método para el escrutinio de un agente terapéutico para la osteoartritis, la artritis reumatoide u otra artritis que comprende el escrutinio de agentes candidatos a un agente capaz de tratar la osteoartritis, la artritis reumatoide u otra artritis utilizando la actividad de GC-B como indicación. Como se ha descrito anteriormente, la actividad de GC-B se puede determinar como la actividad de la guanil ciclasa, por ejemplo la cantidad de GMPc intracelular producido.

En una realización descrita en la presente memoria, el método de escrutinio descrito anteriormente puede incluir las etapas de: preparación de las células que expresan GC-B, o células de condrocitos articulares; el cultivo de las células en presencia de un agente candidato; y el escrutinio de los agentes candidatos a un agente capaz de tratar la osteoartritis, la artritis reumatoide u otra artritis utilizando la actividad de la guanil ciclasa celular, por ejemplo la cantidad de GMPc intracelular producido, como indicación.

De acuerdo con una realización preferida descrita en la presente memoria, el método de escrutinio comprende la preparación de una línea celular cultivada que había sido forzada a expresar GC-B, el cultivo de la línea celular en presencia o ausencia de un agente candidato, la determinación de la cantidad de GMPc intracelular producido, y el escrutinio de los agentes candidatos a un agente capaz de tratar la osteoartritis, la artritis reumatoide o la artritis utilizando como indicación la diferencia entre las cantidades de GMPc intracelular producido en presencia y ausencia del agente candidato.

El método de escrutinio descrito en la presente memoria puede ser utilizado para escrutar un agente terapéutico para la osteoartritis, la artritis reumatoide u otra artritis, por ejemplo, mediante la expresión de GC-B en células cultivadas tales como células COS-7, la adición de un agente candidato al medio, el cultivo de las células durante un cierto período de tiempo a una cierta temperatura (por ejemplo, 37°C, 5 minutos), y la medición de la cantidad de AMPc intracelular producido (Science 1991; 252: 120-123).

El agente terapéutico o profiláctico descrito en la presente memoria para la artritis, tal como la osteoartritis, se formula en preparaciones para su administración oral o parenteral combinando el activador de GC-B definido anteriormente como ingrediente activo con un vehículo, excipiente, aditivo, o similares farmacéuticamente aceptables.

Los ejemplos de los vehículos y excipientes para la preparación incluyen lactosa, estearato de magnesio, almidón, talco, gelatina, agar, pectina, goma arábiga, aceite de oliva, aceite de sésamo, manteca de cacao, etilenglicol, y otros utilizados convencionalmente.

Los ejemplos de las composiciones sólidas para su administración oral incluyen comprimidos, píldoras, cápsulas, polvos, gránulos, y similares. En tales composiciones sólidas, al menos un ingrediente activo se mezcla con al menos un diluyente inerte, tal como lactosa, manitol, glucosa, hidroxipropilcelulosa, celulosa microcristalina, almidón, polivinilpirrolidona, aluminometasilicato de magnesio, o similares. La composición puede, de acuerdo con un método convencional, contener también aditivos distintos de los diluyentes inertes, por ejemplo, un lubricante tal como estearato de magnesio, un agente disgregante tal como glicolato de calcio fibroso, y un agente auxiliar de disolución tal como ácido glutámico o ácido aspártico. Los comprimidos o píldoras, en caso necesario, se pueden revestir con un glicocálix, tal como sacarosa, gelatina o ftalato de hidroxipropilmetilcelulosa, o con una película gástrica o entérica, o con dos o más capas. También se incluyen cápsulas de un material absorbible, tal como la gelatina.

Las composiciones líquidas para administración oral pueden incluir emulsiones, soluciones, suspensiones, jarabes y elixires farmacéuticamente aceptables, y también pueden contener diluyentes inertes convencionales, tales como agua purificada y etanol. La composición puede contener, aparte del diluyente inerte, un coadyuvante, tal como agentes humectantes y agentes suspensores, un agente edulcorante, un sabor, un aroma, y un conservante.

Los ejemplos de los inyectables parenterales incluyen soluciones, suspensiones, y emulsiones estériles acuosas o no acuosas. Los ejemplos de las soluciones y suspensiones acuosas incluyen agua para inyectables y solución salina fisiológica para inyectables. Los ejemplos de las soluciones y suspensiones no acuosas incluyen propilenglicol, polietilenglicol, aceites vegetales tales como aceite de oliva, alcoholes tales como etanol, y polisorbato 80®. Estas composiciones pueden contener adicionalmente adyuvantes, tales como conservantes, agentes humectantes, emulsionantes, dispersantes, estabilizantes (por ejemplo, lactosa), y agentes auxiliares de disolución (p. ej., ácido glutámico y ácido aspártico). Las sustancias descritas anteriormente se pueden esterilizar por medio de métodos de esterilización convencionales, tales como esterilización mediante filtro con una membrana de microfiltración, esterilización por calor tal como la esterilización en autoclave, o la incorporación de desinfectantes. Los inyectables pueden ser preparaciones líquidas o preparaciones liofilizadas que pueden reconstituirse antes de su uso. Los ejemplos de excipientes para la liofilización incluyen alcoholes de azúcar y azúcares, tales como manitol y glucosa.

El agente terapéutico o profiláctico descrito en la presente memoria se va a administrar mediante métodos de

administración orales o parenterales comúnmente utilizados para los productos farmacéuticos. Se prefieren los métodos de administración parenteral, por ejemplo, inyección (p. ej., inyección subcutánea, intravenosa, intramuscular e intraperitoneal), administración percutánea, administración trans-mucosa (por ejemplo, transnasal y transrectal), y la administración trans-pulmonar. También se puede utilizar la administración oral.

La dosificación de un activador de GC-B, preferiblemente un CNP como se ha definido anteriormente o un derivado del mismo, que es un ingrediente activo contenido en la composición descrita en la presente memoria, se puede determinar dependiendo del tipo de enfermedad a tratar, la gravedad de la enfermedad, la edad del paciente, y similares, y generalmente puede variar de 0,005 g/kg a 100 mg/kg, preferiblemente de 0,02 g/kg a 5 mg/kg, más preferiblemente de 0,02 g/kg a 0,25 mg/kg. Sin embargo, los medicamentos que contienen los CNP de acuerdo con la presente invención no se limitan a estas dosis.

El agente terapéutico o profiláctico descrito en la presente memoria puede combinarse con agentes terapéuticos convencionales o nuevos, tales como fármacos anti-inflamatorios, ácido hialurónico y de esteroides adrenocorticales, así como con operaciones quirúrgicas ortopédicas, tales como la cirugía artroscópica, reemplazo con articulación artificial y osteotomía.

La combinación de un fármaco anti-inflamatorio en particular, por ejemplo al menos un fármaco anti-inflamatorio no esteroideo, con un activador de GC-B (por ejemplo, los CNP definidos anteriormente o derivados de los mismos) pueden proporcionar un efecto inhibidor sinérgico sobre la artritis (Ejemplo 10).

El "fármaco anti-inflamatorio no esteroideo" según se utiliza en la presente memoria se refiere a un fármaco anti-inflamatorio sin cadena principal esteroide, y se prefieren los que tienen la acción de inhibir las enzimas ciclooxigenasas implicadas en la producción de prostaglandinas. Los ejemplos de los fármacos anti-inflamatorios no esteroideos que pueden usarse en la presente invención incluyen, pero no se limitan a, indometacina (por ejemplo, Indacina<sup>™</sup>), Ibuprofeno (por ejemplo, Brufen<sup>™</sup>), piroxicam, ácido salicílico, diclofenaco (por ejemplo, Voltaren<sup>™</sup>), cetoprofeno, naproxeno, y piroxicam.

Además, el efecto sinérgico de una combinación del activador de GC-B descrito anteriormente con un fármaco anti-inflamatorio no esteroideo significa que, en comparación con cuando el activador de GC-B se utiliza solo, la activación de GC-B se mejora, o en otras palabras, el ingrediente activo del fármaco anti-inflamatorio no esteroideo descrito anteriormente sirve como un promotor de la activación en la activación de GC-B con el activador de GC-B.

Por lo tanto, se describe en la presente memoria un promotor de la activación de un activador de GC-B, que comprende un activador no esteroideo.

Los activadores de GC-B incluyen los CNP o derivados de los mismos como se ha definido anteriormente. Los ejemplos de los CNP son CNP-22 y CNP-53 de mamíferos, incluyendo seres humanos, o aves, más específicamente CNP-22 del SEQ ID NO: 1 o CNP-53 del SEQ ID NO: 2. Los ejemplos de los derivados de CNP incluyen aquellos que tienen una delección, sustitución o adición de uno o varios aminoácidos en la secuencia de aminoácidos del SEQ ID NO: 1 o SEQ ID NO: 2, y conservan la actividad de los CNP.

El activador no esteroideo descrito anteriormente es preferiblemente un inhibidor de la ciclooxigenasa. Los ejemplos del inhibidor de la ciclooxigenasa incluyen, pero no se limitan a, indometacina, ibuprofeno, piroxicam, ácido salicílico, diclofenaco, cetoprofeno, naproxeno y piroxicam.

Las descripciones anteriores de la forma de dosificación, la dosificación y el método administración de los agentes terapéuticos y profilácticos descritos en la presente memoria se pueden aplicar tal cual al promotor de la activación, descrito en la presente memoria.

Un método para la activación de un activador de GC-B, en donde se utiliza el promotor de la activación descrito anteriormente, también se describe en la presente memoria.

El promotor de activación y el método descrito anteriormente se pueden utilizar, por ejemplo, para el tratamiento de enfermedades, tales como la artritis, de manera eficaz en el paciente a través de la activación de GC-B.

La descripción incluye los siguientes elementos.

- (1) Un agente terapéutico o profiláctico para la artritis que comprende un activador de la guanil ciclasa B (GC-B) como ingrediente activo.
- (2) El agente terapéutico o profiláctico de acuerdo con el apartado (1) anterior, en donde la artritis es la osteoartritis.
- (3) El agente terapéutico o profiláctico de acuerdo con el apartado (2) anterior, en donde la osteoartritis es la osteoartritis de las articulaciones que soportan peso o que no soportan peso.

- (4) El agente terapéutico o profiláctico de acuerdo con el apartado (3) anterior, en donde la osteoartritis es la gonartrosis degenerativa.
- (5) El agente terapéutico o profiláctico de acuerdo con el apartado (3) anterior, en donde la osteoartritis es la coxartrosis degenerativa.
- 5 (6) El agente terapéutico o profiláctico de acuerdo con el apartado (3) anterior, en donde la osteoartritis es la artrosis temporomandibular.
- (7) El agente terapéutico o profiláctico de acuerdo con el apartado (1) anterior, en donde la artritis es causada por la artritis reumatoide.
- 10 (8) El agente terapéutico o profiláctico de acuerdo con el apartado (1) anterior, en donde la artritis es causada por la osteoartritis.
- (9) El agente terapéutico o profiláctico de acuerdo con cualquiera de los apartados (1) a (8) anteriores, en donde el activador de GC-B es un péptido natriurético tipo C (CNP) o un derivado del mismo.
- (10) El agente terapéutico o profiláctico de acuerdo con el apartado (9) anterior, en donde el CNP se selecciona entre el CNP-22 y el CNP-53 procedentes de mamíferos, incluyendo seres humanos, o aves.
- 15 (11) El agente terapéutico o profiláctico de acuerdo con el apartado (9) anterior, en donde el CNP es el CNP-22 del SEQ ID NO: 1 o el CNP-53 del SEQ ID NO: 2.
- (12) El agente terapéutico o profiláctico de acuerdo con el apartado (9) anterior, en donde el derivado tiene una delección, sustitución o adición de uno o varios aminoácidos en la secuencia de aminoácidos del SEQ ID NO: 1 o el SEQ ID NO: 2, y tiene la actividad de los CNP.
- 20 (13) El agente terapéutico o profiláctico de acuerdo con cualquiera de los apartados (1) a (12) anteriores, que comprende adicionalmente al menos un fármaco anti-inflamatorio no esteroideo.
- (14) Un agente para promover el crecimiento de los condrocitos articulares que comprende un activador de GC-B como ingrediente activo.
- 25 (15) El agente de acuerdo con el apartado (14) anterior, en donde el activador de GC-B es un CNP o un derivado del mismo.
- (16) El agente de acuerdo con el apartado (15) anterior, en donde el CNP es el CNP-22 o el CNP-53 de mamíferos, incluyendo seres humanos, o aves.
- (17) El agente de acuerdo con el apartado (15) anterior, en donde el CNP es el CNP-22 del SEQ ID NO: 1 o el CNP-53 del SEQ ID NO: 2.
- 30 (18) El agente de acuerdo con el apartado (15) anterior, en donde el derivado tiene una delección, sustitución o adición de uno o varios aminoácidos en la secuencia de aminoácidos del SEQ ID NO: 1 o el SEQ ID NO: 2, a la vez que posee una actividad de los CNP.
- (19) El agente de acuerdo con cualquiera de los apartados (14) a (18) anteriores, que comprende adicionalmente al menos un fármaco anti-inflamatorio no esteroideo.
- 35 (20) Un método para inhibir la artritis, en donde la artritis se inhibe mediante la activación de GC-B.
- (21) El método para la inhibición de acuerdo con el apartado (20) anterior, en donde el GC-B es activado por un CNP o un derivado del mismo.
- (22) El método para la inhibición de acuerdo con el apartado (21) anterior, en donde el CNP es el CNP-22 o el CNP-53 de mamíferos, incluyendo seres humanos, o aves.
- 40 (23) El método para la inhibición de acuerdo con el apartado (21) anterior, en donde el CNP es el CNP-22 del SEQ ID NO: 1 o el CNP-53 del SEQ ID NO: 2.
- (24) El método para la inhibición de acuerdo con el apartado (21) anterior, en donde el derivado tiene una delección, sustitución o adición de uno o varios aminoácidos en la secuencia de aminoácidos del SEQ ID NO: 1 o el SEQ ID NO: 2, a la vez que posee una actividad de los CNP.
- 45 (25) El método para la inhibición de acuerdo con cualquiera de los apartados (20) a (24) anteriores, en donde el GC-B es activado por una combinación de un CNP o un derivado del mismo y al menos un fármaco anti-inflamatorio no esteroideo.
- (26) Un método para promover el crecimiento de los condrocitos articulares, en donde el crecimiento de los condrocitos articulares se acelera mediante la activación de la GC-B.
- 50 (27) El método de acuerdo con el apartado (26) anterior, en donde el GC-B es activado por un CNP o un derivado del mismo.
- (28) El método de acuerdo con el apartado (27) anterior, en donde el CNP es el CNP-22 o el CNP-53 procedentes de mamíferos, incluyendo seres humanos, o aves.
- (29) El método de acuerdo con el apartado (27) anterior, en donde el CNP es el CNP-22 del SEQ ID NO: 1 o el CNP-53 del SEQ ID NO: 2.
- 55 (30) El método de acuerdo con el apartado (27) anterior, en donde el derivado tiene una delección, sustitución o adición de uno o varios aminoácidos en la secuencia de aminoácidos del SEQ ID NO: 1 o el SEQ ID NO: 2, a la vez que posee una actividad de los CNP.
- (31) El método de acuerdo con cualquiera de los apartados (26) a (30) anteriores, en donde el GC-B es activado por una combinación de un CNP o un derivado del mismo y al menos un fármaco anti-inflamatorio no esteroideo.
- 60 (32) Un método para el escrutinio de un promotor del crecimiento de los condrocitos articulares que comprende el escrutinio de un agente candidato para determinar la capacidad de promover los condrocitos articulares mediante la actividad de GC-B como indicación.

(33) El método de acuerdo con el apartado (32) anteriormente, que comprende la preparación de células cultivadas que expresan GC-B, o células de condrocitos articulares, el cultivo de las células en presencia de un agente candidato, y el escrutinio de los agentes candidatos para determinar la capacidad de promover el crecimiento de los condrocitos articulares utilizando la actividad de la GC-B de las célula como indicación.

(34) El método de acuerdo con el apartado (32) o (33) anteriores, en donde la actividad de GC-B se determina como una cantidad de GMPc intracelular producido.

(35) El método de acuerdo con cualquiera de los apartados (32) a (34) anteriores, que comprende la preparación de una línea celular cultivada que había sido forzada a expresar GC-B, el cultivo de la línea celular en presencia o ausencia de un agente candidato, la determinación de la cantidad de GMPc intracelular producida, y la detección de los agentes candidatos para determinar la capacidad de acelerar el crecimiento de los condrocitos articulares utilizando, como indicación, la diferencia entre las cantidades de GMPc intracelular producido en presencia y ausencia del agente candidato.

(36) Un método para el escrutinio de un agente terapéutico para la osteoartritis, la artritis reumatoide u otra artritis que comprende el escrutinio de agentes candidatos a un agente capaz de tratar la osteoartritis, la artritis reumatoide u otra artritis mediante el uso de la actividad de GC-B como indicación.

(37) El método de acuerdo con el apartado (36) anterior, que comprende la preparación de células cultivadas que expresan GC-B, o células de condrocitos articulares, la incubación de las células en presencia de un agente candidato, y el escrutinio de los agentes candidatos a un agente capaz de tratar la osteoartritis, la artritis reumatoide u otra artritis utilizando la actividad de GC-B celular como indicación.

(38) El método de acuerdo con el apartado (36) o (37) anteriores, en donde la actividad de GC-B se determina como una cantidad de GMPc intracelular producido.

(39) El método de acuerdo con cualquiera de los apartados (36) a (38) anteriores, que comprende la preparación de una línea celular cultivada que había sido obligada a expresar GC-B, el cultivo de la línea celular en presencia o ausencia de un agente candidato, la determinación de la cantidad de GMPc intracelular producido, y la detección de los agentes candidatos a un agente capaz de tratar la osteoartritis, la artritis reumatoide u otra artritis utilizando como indicación la diferencia entre las cantidades de GMPc intracelular producido en presencia y ausencia del agente candidato.

(40) Un agente terapéutico o profiláctico para la osteoartritis que comprende un activador de la guanil ciclasa B (GC-B) como ingrediente activo.

(41) El agente terapéutico o profiláctico para la osteoartritis de acuerdo con el apartado (40) anterior, que comprende adicionalmente al menos un fármaco anti-inflamatorio no esteroideo.

(42) Un agente terapéutico o profiláctico para la artritis reumatoide que comprende un activador de la guanil ciclasa B (GC-B) como ingrediente activo.

(43) El agente terapéutico o profiláctico para la artritis reumatoide de acuerdo con el apartado (42) anterior, que comprende adicionalmente al menos un fármaco anti-inflamatorio no esteroideo.

(44) Un método para el tratamiento de la artritis que comprende administrar un activador de GC-B a un paciente que necesite tratamiento para la artritis.

(45) El método de acuerdo con el apartado (44) anterior, en donde el activador de GC-B es un CNP o un derivado del mismo.

(46) El método de acuerdo con el apartado (44) o (45) anterior, en donde la artritis es la osteoartritis.

(47) El método de acuerdo con el apartado (46) anterior, en donde la osteoartritis es la osteoartritis de las articulaciones que soportan peso o que no soportan peso.

(48) El método de acuerdo con el apartado (47) anterior, en donde la osteoartritis degenerativa es la gonartrosis, la coxartrosis degenerativa, o la artrosis temporomandibular.

(49) El método de acuerdo con el apartado (44) anterior, en donde la artritis es causada por la artritis reumatoide.

(50) El método de acuerdo con el apartado (44) anterior, en donde la artritis es causada por la osteoartritis.

(51) El método de acuerdo con cualquiera de los apartados (45) a (50) anteriores, en donde el CNP se selecciona entre el CNP-22 y el CNP-53 procedentes de mamíferos, incluyendo seres humanos, o aves.

(52) El método de acuerdo con cualquiera de los apartados (45) a (50) anteriores, en donde el CNP es el CNP-22 del SEQ ID NO: 1 o el CNP-53 del SEQ ID NO: 2.

(53) El método de acuerdo con cualquiera de los apartados (45) a (50) anteriores, en donde el derivado tiene una delección, sustitución o adición de uno o varios aminoácidos en la secuencia de aminoácidos del SEQ ID NO: 1 o el SEQ ID NO: 2, a la vez que posee una actividad de los CNP.

(54) El método de acuerdo con cualquiera de los apartados (44) a (53) anteriores, en donde el activador de GC-B está contenido combinado con al menos un fármaco anti-inflamatorio no esteroideo.

(55) Un promotor de la activación de un activador de GC-B, que comprende un activador no esteroideo.

(56) El promotor de la activación de acuerdo con el apartado (55) anterior, en donde el activador de GC-B es un CNP o un derivado del mismo.

(57) El promotor de activación de acuerdo con el apartado (56) anterior, en donde el CNP se selecciona entre el CNP-22 y el CNP-53 de mamíferos, incluyendo seres humanos, o aves.

(58) El promotor de la activación de acuerdo con el apartado (56) anterior, en donde el CNP es el CNP-22 del SEQ ID NO: 1 o el CNP-53 del SEQ ID NO: 2.

(59) El promotor de activación de acuerdo con el apartado (56) anterior, en donde el derivado tiene una

deleción, sustitución o adición de uno o varios aminoácidos en la secuencia de aminoácidos del SEQ ID NO: 1 o el SEQ ID NO: 2, a la vez que posee una actividad de los CNP.

(60) El promotor de activación de acuerdo con el apartado (55) anterior, en donde el activador no esteroideo es un inhibidor de la ciclooxigenasa.

(61) El promotor de activación de acuerdo con el apartado (60) anterior, en donde el inhibidor de la ciclooxigenasa se selecciona del grupo que consiste en indometacina, ibuprofeno, piroxicam, ácido salicílico, diclofenaco, cetoprofeno, naproxeno y piroxicam.

(62) Un método para la activación de un activador de GC-B, en donde se utiliza se utiliza el promotor de la activación de acuerdo con cualquiera de los apartados (55) a (61) anteriores.

La invención se describirá con más detalle mediante los siguientes ejemplos.

### Ejemplos

#### Ejemplo 1: Construcción del vector para la preparación de ratón transgénico para CNP

Como se muestra en la Fig. 1A, el ADNc de CNP murino (526 pb; FEBS Lett. 276:209-213, 1990) se subclonó en vector pGEM-T Easy (Promega), y a continuación se cortó con Pst I y se formaron extremos romos para preparar un ADNc de CNP de ratón. El vector de PSG 1 (Promega; Fig. 1B) se cortó con EcoRI, se formaron extremos romos y se ligó con el ADNc de CNP murino, como se muestra en la Fig. 1C, para preparar un vector SAP-MCNP (pSG1-CNP).

#### Ejemplo 2: Producción del ratón transgénico para CNP

Un fragmento de ADN para inyección se preparó como sigue. El vector SAP-mCNP (pSG1-CNP; Fig. 1C) con un gen CNP insertado se trató primero con Hind III y Xho I para cortar un fragmento (aproximadamente 2,3 kb) que contenía el gen CNP. El fragmento se recogió a continuación, utilizando Gel Extraction Kit (QIAGEN), y se diluyó con PBS a una concentración de 3 ng/μl, obteniendo de este modo el fragmento de ADN para inyección (Fig.2).

El huevo de ratón en la fase de pronúcleo en el que se inyectó el fragmento de ADN se recogió de la siguiente manera. En primer lugar, a una hembra de ratón C57BL/6 (Clea Japan, Inc.) se le inyectaron por vía intraperitoneal 5 U.I. de gonadotropina de suero de yegua preñada (PMSG), y 48 horas más tarde, con 5 U.I. de gonadotropina coriónica humana (hCG), con el fin de inducir la superovulación. Este ratón hembra se cruzó con un ratón macho congénico. A la siguiente mañana del cruce, en el ratón hembra se confirmó la presencia de un tapón y, posteriormente, el oviducto se perfundió para recoger un huevo de ratón en la fase de pronúcleo.

El fragmento de ADN para inyección se inyectó en el pronúcleo del huevo utilizando un micromanipulador (Latest Technology in Gene Targeting (Yodosha, Japan), 190-207, 2000). Específicamente, el fragmento de ADN se inyectó en 660 embriones C57BL/6J, y al día siguiente, se trasplantaron 561 embriones en la etapa celular 2 a los oviductos de hembras receptoras el día 1 del falso embarazo a aproximadamente 10 por cada lado del oviducto (aproximadamente 20/animal).

Las hembras receptoras, las cuales no habían sido liberadas de las crías antes de la fecha prevista del parto, fueron sometidas a cesárea, lo que dio como resultado el nacimiento de crías que fueron criadas por una madre adoptiva. Se obtuvieron 136 crías en total, de las cuales 5 eran ratones transgénicos con un gen CNP introducido (en lo sucesivo denominado "Tgm"). En lo sucesivo, el ratón obtenido inicialmente es referido como Fundador.

Todos los ratones Fundadores eran macho, y la posterior generación de descendientes (es decir, ratones F1) se obtuvieron a partir de cuatro de las cinco líneas.

#### Ejemplo 3: Análisis del Genotipo del ratón transgénico para CNP

El análisis del genotipo se realizó mediante transferencia de Southern de acuerdo con procedimientos descritos a continuación.

Se tomó la cola (aproximadamente 15 mm) del ratón de 3 semanas de edad y se trató con proteinasa K (a 55°C, con sacudimiento a 100 rpm a lo largo del día y la noche) para obtener una disolución de lisis. A continuación, la disolución obtenida se sometió a un separador de ácido nucleico automatizado (KURABO NA-1000; Kurabo, Japón) para preparar ADN genómico. El ADN genómico (15 g) se trató con Pvu II (200 U), después con fenol-cloroformo para eliminar la enzima de restricción, y se precipitó con etanol para recoger el ADN. El ADN obtenido se disolvió en 25 μl de TE y se sometió a electroforesis en gel de agarosa 0,7% (a voltaje constante 50V), a continuación, el gel se trató con una disolución de HCl 0,25 M durante 15 minutos para escindir el ADN, se lavó con agua, y se transfirió durante la noche a una membrana de nailon en una disolución 0,4 M de NaOH. Después de eso, el ADN en la membrana se fijó mediante el método de entrecruzamiento UV. La membrana de trató (a 42°C durante 2 horas) con

una disolución de hibridación (formamida al 50%, 0,5 x disolución de Denhardt, SDS 0,5%, 5x SSPE), y una sonda marcada con  $^{32}\text{P}$ , que había sido preparada con BcaBEST Labeling Kit (Takara, Japón) utilizando el ADNc de CNP (aproximadamente 0,5 kb) como molde, se añadió a la membrana de hibridación a 42°C durante la noche. Después del tratamiento con una disolución de detergente (2x SSC, SDS al 0,1%) a 55°C durante 20 minutos, la membrana se expuso a una Imaging Plate (Fuji Film) durante la noche para detectar señales del transgén utilizando BAS2000 (Fuji Film, Japón) (Fig.3). En el ratón de tipo salvaje (WT) se detectaron 3 señales (gen CNP de tipo salvaje), mientras que en el ratón transgénico (Tgm) se detectaron 2 señales (transgén) derivadas del transgén además del gen CNP de tipo salvaje.

#### Ejemplo 4: Expresión de CNP en el ratón transgénico para CNP

Se utilizó un kit de medición de CNP-22 EIA (PHOENIX Pharmaceuticals Inc.) para la determinación de un nivel de CNP.

Tres ratones transgénicos para CNP macho y hembra de 7 semanas de edad, así como 3 camadas normales macho y hembra de ratones, se sacrificaron mediante exanguinación de la postcava bajo anestesia con éter.

El hígado, que es un órgano que se espera que exhiba alta expresión del transgén, se eliminó, y el tampón de análisis del kit de medición anterior se añadió a 1 ml por 0,1 g de peso del hígado, seguido de enfriamiento en hielo. El hígado se homogeneizó en un mezclador Waring (Physoctron), y después de la centrifugación (a 2000 rpm durante 5 minutos), el sobrenadante se utilizó como una muestra para la determinación de los niveles de CNP-22.

Se añadieron 1 mg de etilendiaminotetraacetato-4Na (Junsei Chemical Co., Ltd., Japón) y 2 unidades de inhibición con tripsina de aprotinina (Sigma) a la sangre extraída y se agitó para separar plasma sanguíneo, que se usó como muestra para la determinación de los niveles de CNP-22.

Los resultados se muestran en la Tabla 1.

Tabla 1: expresión de CNP en ratón transgénico para CNP

|              |       | Hígado           |                   | Plasma  |                 |
|--------------|-------|------------------|-------------------|---------|-----------------|
|              |       | (ng/g de tejido) | media $\pm$ DT    | (ng/ml) | media $\pm$ DT  |
| Tipo salvaje | Núm,1 | 38,8             | 29,3 $\pm$ 20,5   | 0,3     | 0,3 $\pm$ 0,06  |
|              | Núm,2 | 5,9              |                   | 0,4     |                 |
|              | Núm,3 | 43,3             |                   | 0,3     |                 |
| CNP tgm      | Núm,1 | 293,3            | 290 $\pm$ 81,7 ** | 10,3    | 8,0 $\pm$ 4,7 * |
|              | Núm,2 | 370,0            |                   | 11,1    |                 |
|              | Núm,3 | 206,7            |                   | 2,6     |                 |

\*\* :  $p < 0.01$  (prueba t de Student para datos independientes)

# :  $p < 0,05$  (prueba de suma de rangos de Wilcoxon)

El ratón transgénico para CNP mostró de aproximadamente 10 veces y aproximadamente 24 veces mayor nivel de CNP-22 en el hígado y el plasma sanguíneo, respectivamente, que el tipo salvaje cuando los valores de la media  $\pm$  DT se compararon entre sí. En cada caso la diferencia fue estadísticamente significativa. Se confirmó, a partir de los resultados, que el péptido CNP se expresa en exceso en el ratón transgénico para CNP.

#### Ejemplo 5: Análisis histológico del cartílago articular del ratón transgénico para CNP

Para llevar a cabo el análisis histológico del cartílago articular para determinar el grosor y el número de condrocitos, 5 ratones transgénicos para CNP hembra de 9 semanas de edad, y camadas normales macho y hembra de los ratones fueron sacrificados mediante exanguinación de la postcava bajo anestesia con éter, y el fémur se fijó en formalina al 20% durante una semana. Después de la inmersión en una disolución acuosa al 20% de EDTA-4Na (pH 7,4) (Junsei Chemical Co., Ltd., Japón) para la descalcificación, la facies patellaris femoris se sometió a una sección sagital en la línea media y se incluyó en parafina por medio de un método convencional para preparar los bloques de parafina. Una sección de 4 mm de grosor se seccionó adicionalmente con un micrótopo para preparar secciones de parafina, que se tiñeron con tinción de hematoxilina-eosina. Para determinar el grosor del cartílago articular, se incorporó un campo microscópico 1 observado utilizando una lente de objetivo (X10) a un programa de análisis de imagen (IPAP, Sumika Technoservice, Japón), y se midió la longitud en cinco puntos en el campo utilizando el programa para calcular un promedio de la longitud, cuyo promedio se utilizó como grosor del cartílago

articular del individuo. El mismo campo se midió para determinar también el número de condrocitos. Los valores medios y las desviaciones típicas para estos artículos se calcularon en ratones normales y en ratones transgénicos para CNP del mismo sexo (Microsoft Excel 2000, Microsoft), y se realizó un análisis estadístico utilizando la prueba t de Student (SAS ver.6.12, SAS Institute Japan, Japón).

Los ratones transgénicos para CNP, ratones tanto macho como hembra, demostraron que tenían cartílago articular significativamente más grueso (Figura 4). Además, se demostró que el número de condrocitos articulares por campo microscópico era estadísticamente significativamente mayor tanto en ratones transgénicos para CNP tanto macho como hembra (Figura 5).

Estos resultados revelaron que las sustancias activadoras de GC-B (NPR-B) tales como los CNP pueden aumentar el grosor del cartílago articular aumentando el número de condrocitos, así como aumentando el volumen de células debido a la hipertrofia de los condrocitos individuales como es conocido generalmente [J Biol Chem. 2003; 278(21): 18824-32].

#### Ejemplo 6: Resistencia del ratón transgénico para CNP al modelo de osteoartritis

Se creó un modelo animal de osteoartritis mediante la inyección de colagenasa en la articulación de la rodilla para desestabilizar el ligamento de la articulación de la rodilla y el menisco (Am. J. Pathol. 1989; 135:1001-14). La resistencia a la artritis y la degeneración del cartílago articular se evaluó en este modelo animal utilizando un ratón transgénico para CNP para confirmar los efectos preventivos y terapéuticos de los CNP en la osteoartritis. Se inyectaron dos veces 6 µl de disolución de colagenasa de tipo II al 3% (Sigma) en solución salina fisiológica (día de dosificación inicial y después de 7 días) en la articulación de la rodilla derecha de ratones transgénicos para CNP y la camada de ratones de la cepa C57BL/6 de tipo salvaje. Se midió la anchura de las articulaciones de las rodillas derecha e izquierda a lo largo del tiempo con un calibre (Mitutoyo Corp., Japón) durante 28 días después de la administración, y la diferencia entre las articulaciones de las rodillas derecha e izquierda se calculó para representar la hinchazón de las articulaciones de rodilla. El área bajo la curva (AUC) en el curso del tiempo de los cambios sucesivos se calculó por medio del método trapezoidal, y se comparó mediante la prueba t de Student entre el ratón transgénico para CNP y el ratón de tipo salvaje. El resultado de que el AUC fue significativamente menor en el ratón transgénico para CNP que en el tipo salvaje indica que el ratón transgénico para CNP es resistente a la inflamación de las articulaciones de rodilla causada por la colagenasa (Figura 6). Para llevar a cabo la evaluación histopatológica de la artritis y la degeneración del cartílago articular, la articulación de la rodilla se retiró después de la eutanasia mediante exanguinación bajo anestesia con éter el día 28 después de la administración de la colagenasa, y se prepararon muestras teñidas con hematoxilina-eosina o con safranina-O como se describe en Ejemplo 5, y se analizaron histológicamente. Como resultado, el ratón de tipo salvaje mostró un marcado crecimiento celular sinovial, granulación e infiltración celular inflamatoria en la membrana sinovial inducidos por colagenasa, mientras que estos cambios se redujeron notablemente en el ratón transgénico para CNP (Figura 7). Para la degeneración del cartílago articular, el ratón de tipo salvaje mostró una disminución de la capacidad de tinción con safranina O y una disminución del contenido de proteoglicanos en el cartílago articular, mientras que estos cambios fueron leves en el ratón transgénico para CNP, y esto proporciona evidencia histopatológica de que el ratón transgénico para CNP es resistente a los cambios degenerativos en el cartílago articular causados por la administración de colagenasa (Figura 8). El nivel de CNP en plasma tal como se determina utilizando un kit de EIA (Phoenix Pharmaceutical) fue un promedio de 0,21 ng/ml en el ratón de tipo salvaje y de 0,50 ng/ml en el ratón transgénico para CNP.

Estos resultados revelaron que los CNP tienen acción inhibitoria sobre la artritis y los cambios degenerativos en el cartílago articular en la osteoartritis.

#### Ejemplo 7: Efecto terapéutico de la infusión de CNP en el modelo de osteoartritis (1)

Una bomba osmótica (modelo 2004, Durect) que contenía las soluciones de más abajo se trasplantó subcutáneamente al dorso de un ratón de la cepa C57BL/6 J macho, de 9 semanas de edad.

- Disolvente: Agua destilada que contiene dextrosa al 5% (Junsei Chemical Co., Ltd., Japón), manosa al 10% (Nacalai Tesque Inc., Japón) y ácido clorhídrico de 5 mmol/L (Wako Pure Chemical Industries, Japón).
- Disolución de 10 mg/ml (60 ng/día) de CNP-22 (Calbiochem Novabiochem).
- Disolución de 100 mg/ml (600 ng/día) de CNP-22 (Calbiochem Novabiochem).

Seis días después del trasplante, se inyectaron 6 µl de disolución de colagenasa de tipo II al 1,5% (Sigma) en la articulación de la rodilla derecha, se midió la anchura de las articulaciones de las rodillas derecha e izquierda a lo largo del tiempo con un calibre (Mitutoyo Corp., Japón) durante 28 días después de la inyección, y se calculó la diferencia entre las articulaciones de las rodillas derecha e izquierda. Esta diferencia representó la hinchazón de las articulaciones de rodilla, y la AUC se comparó entre el control con disolvente y grupos con CNP mediante la prueba t de Student (SAS ver. 6.12). Los resultados mostraron que el valor AUC fue significativamente menor en el grupo de CNP-22 a cualquiera de las dosis en comparación con el grupo de control de disolvente. Se prepararon muestras

teñidas con hematoxilina-eosina y teñidas con safranina O de acuerdo con el método descrito en el Ejemplo 5, y se analizaron histopatológicamente.

Como resultado, el grupo de control con disolvente mostró marcado crecimiento celular sinovial, granulación e infiltración de células inflamatorias en la membrana sinovial inducida por colagenasa, mientras que estos cambios se redujeron notablemente en el grupo con CNP (Figura 9). Estos resultados de los tejidos sinoviales revelaron que los CNP tienen un efecto terapéutico sobre la osteoartritis.

Ejemplo 8: Efecto terapéutico de la infusión de CNP sobre el modelo de osteoartritis (2)

Una bomba osmótica (modelo 2004, Durect) que contenía las siguientes disoluciones se transplantó por vía subcutánea al dorso de un ratón de la cepa C57BL/6 J macho, de 9-semanas de edad (CLEA Japan, Japón).

- Disolvente: Agua destilada que contiene dextrosa al 5% (Junsei Chemical Co., Ltd., Japón), manosa al 10% (Nacalai Tesque Inc., Japón) y ácido clorhídrico de 5 mmol/L (Wako Pure Chemical Industries, Japón).
- Disolución de 10 mg/ml (60 ng/día) de CNP-22 (Calbiochem Novabiochem).
- Disolución de 100 mg/ml (600 ng/día) de CNP-22 (Calbiochem Novabiochem).

Al día siguiente del trasplante, el ratón se anestesió con éter y se sometió a los procedimientos quirúrgicos de escisión del ligamento anterocrucial, escisión del ligamento colateral medial y resección total del menisco medial de la articulación de la rodilla derecha para inducir la osteoartritis. La anchura de las articulaciones de las rodillas derecha e izquierda se midió a lo largo del tiempo con un calibre (Mitutoyo Corp.) durante 11 días después de la administración, y se calculó la diferencia entre las articulaciones de las rodillas derecha e izquierda. Esta diferencia representó la hinchazón de las articulaciones de rodilla, y la AUC se comparó entre el control con disolvente y los grupos con CNP mediante la prueba t de Student (SAS Preclinical Package, SAS Institute Japan, Japón). Los resultados mostraron que el valor de AUC fue significativamente menor en el grupo de CNP-22 a cualquiera de las dosis en comparación con el grupo control de disolvente (Figura 10).

Los resultados revelaron que los CNP también son eficaces en la inhibición de la artritis en la osteoartritis causada por sobrecarga física en la articulación de la rodilla como resultado de procedimientos quirúrgicos.

Ejemplo 9: Efecto combinado de fármaco antiinflamatorio no esteroideo (AINE) y CNP en el modelo de OA inducida por colagenasa

Una bomba osmótica (modelo 2004, Durect) que contenía las disoluciones siguientes se transplantó subcutáneamente al dorso de un ratón de la cepa C57BL/6 J macho, de 9 semanas de edad.

- Disolvente: Agua destilada que contiene dextrosa al 5% (Junsei Chemical Co., Ltd., Japón), manosa al 10% (Nacalai Tesque Inc., Japón) y ácido clorhídrico de 5 mmol/L (Wako Pure Chemical Industries, Japón).
- Disolución de 1 mg/ml (6 ng/día) de CNP-22 (Calbiochem Novabiochem).

Además, para examinar el efecto del AINE indometacina (Sigma) cuando se utiliza sola y combinada con el CNP, se administró oralmente una suspensión de indometacina en carboximetilcelulosa al 0,2% (Nacalai Tesque Inc., Japón) de manera forzada a 1 mg/kg una vez al día durante 4 días sucesivos a partir de la fecha de trasplante de la bomba descrito anteriormente.

Los grupos experimentales se establecieron de la siguiente manera.  
Control de disolvente (disolvente infundido, administrado por vía oral)  
CNP 6 ng/día  
Indometacina 1 mg/kg  
CNP 6 ng/día + indometacina 1 mg/kg

En la fecha del trasplante de la bomba y el día siguiente, se inyectaron en la articulación de la rodilla derecha disoluciones de 6 µl de colagenasa tipo II (Sigma) al 0,15% y 6 µl de colagenasa tipo II al 1,5%, respectivamente, la anchura de las articulaciones de las rodillas derecha e izquierda se midió diariamente con un calibre (Mitutoyo Corp., Japón) durante 7 días después de la inyección, y se calculó la diferencia entre las articulaciones de las rodillas derecha e izquierda. Esta diferencia representó la hinchazón de las articulaciones de la rodilla, y las AUC se comparó entre el control con disolvente y los grupos con CNP mediante la prueba t de Student (SAS ver. 6,12).

Como resultado, la indometacina cuando se utilizó sola no fue inhibidora de la inflamación de las articulaciones de las rodillas. El grupo al que se administró CNP a 6 ng/día inhibió significativamente la inflamación de las articulaciones de las rodillas. El grupo al que se administró la combinación de CNP y la indometacina mostró una inhibición significativamente más fuerte para la inflamación de las articulaciones de la rodilla en comparación con el grupo al que solo se administró el CNP (Figura 11). Estos resultados revelaron que el CNP cuando se usa solo es

significativamente más eficaz en la inhibición de la hinchazón de las articulaciones de rodilla en comparación con el AINE, que es un anti-artrítico convencional, y también tiene un efecto sinérgico cuando se utiliza en combinación con el AINE.

#### 5 Ejemplo 10: Efecto de los CNP en el modelo de rata de artritis inducida por coadyuvante

Una bomba osmótica (modelo 2004, Durect) que contenía las disoluciones siguientes se trasplantó subcutáneamente al dorso una rata de la cepa LEW/Crj (Charles River Laboratories Japan, Inc., Japón) macho, de 6 semanas de edad.

- 10 · Disolvente: Agua destilada que contiene dextrosa al 5% (Junsei Chemical Co., Ltd., Japón), manosa al 10% (Nacalai Tesque Inc., Japón) y ácido clorhídrico de 5 mmol/L (Wako Pure Chemical Industries, Japón).  
· Disolución de 10 mg/ml (60 ng/día) de CNP-22 (Calbiochem Novabiochem).

15 Al día siguiente del trasplante, se suspendió polvo de bacterias de la tuberculosis muertas (M. TUBERCULOSIS DES. H37 RA, DIFCO LABORATORIES) en parafina líquida (Junsei Chemical Co., Ltd., Japón) a una concentración de 3 mg/ml, y se inocularon 50 µl en la piel en la raíz de una cola de rata. Después de la inoculación, se evaluaron las condiciones de los extremos de las extremidades de acuerdo con los siguientes criterios diariamente utilizando un sistema de puntuación, y la suma de las puntuaciones de los extremos de las extremidades se calculó para representar la puntuación de la artritis del individuo.

20 Puntuación 0: Sin lesión

Puntuación 1: Se observa erupción/inflamación en una o más articulaciones de los dedos. O se produce enrojecimiento en la parte posterior de la pata sin hinchazón.

Puntuación 2: Se produce leve hinchazón en la parte posterior de la extremidad anterior o de la extremidad posterior.

25 Puntuación 3: Se produce inflamación grave en la parte posterior de la extremidad anterior o de la extremidad posterior, pero no en todos los dedos.

Puntuación 4: Se produce inflamación severa en la parte de posterior y los dedos de la extremidad anterior o de la extremidad posterior.

30 Los resultados mostraron que la puntuación de la artritis fue algo menor en el grupo de CNP que en el grupo de control con disolvente (Figura 12A).

También se midieron los cambios en el peso corporal diariamente. Los resultados mostraron que el peso corporal aumentó significativamente en el grupo con CNP en comparación con el grupo de control con disolvente (Figura 12B).

35 Estos resultados revelaron que los CNP también inhiben la artritis y mejoran el estado general en un modelo de rata con coadyuvante.

#### 40 Ejemplo 11: Efecto de los CNP en el modelo de rata de artritis inducida por colágeno

Una bomba osmótica (modelo 2004, Durect) que contenía las disoluciones siguientes se trasplantó subcutáneamente al dorso una rata de la cepa DA/Slc (Japan SLC, Inc., Japón) hembra, de 10 semanas de edad.

- 45 · Disolvente: Agua destilada que contiene dextrosa al 5% (Junsei Chemical Co., Ltd., Japón), manosa al 10% (Nacalai Tesque Inc., Japón) y ácido clorhídrico de 5 mmol/L (Wako Pure Chemical Industries, Japón).  
· Disolución de 1 mg/ml (6 µg/día) de CNP-22 (Calbiochem Novabiochem).

50 Inmediatamente después del trasplante, se disolvió colágeno de tipo II bovino (Collagen Technology Training Co., Japón) en ácido acético acuoso de 0,1 moles/L con el fin de producir 1,5 mg/ml y se suspendió en un volumen igual de coadyuvante incompleto de Freund (DIFCO LABORATORIES), y 400 µl de la suspensión se inocularon en la piel del dorso de una rata. Los cambios en el peso corporal se midieron también diariamente. Además, también se midieron los cambios en el peso corporal en un grupo normal sin recibir ni trasplante de bomba ni inoculación.

55 Como resultado, el peso corporal se redujo significativamente en el grupo de control con disolvente en comparación con el grupo normal, mientras que la pérdida de peso corporal en el grupo con CNP fue significativamente menor en comparación con el grupo control con disolvente (Figura 13). Estos resultados revelaron que el CNP mejora las condiciones generales en un modelo de rata de artritis inducida por colágeno.

#### **Aplicabilidad industrial**

60 Debido a que los agentes terapéuticos o profilácticos de acuerdo con la presente invención que contienen un activador de GC-B como ingrediente activo pueden aumentar el grosor del cartílago articular y el número de condrocitos articulares, proporcionar resistencia a la hinchazón articular, inhibir cambios degenerativos en el cartílago articular, proporcionar cambios notablemente disminuidos en el crecimiento de las células sinoviales, la granulación y la infiltración celular inflamatoria, y evitar una disminución en el contenido de proteoglicanos en el

cartílago articular, son útiles para el tratamiento o la prevención de la artritis incluyendo la osteoartritis, tales como la gonartrosis degenerativa, la coxartrosis degenerativa, la osteoartritis del codo, la osteoartritis espinal y artrosis temporomandibular. La administración de la composición farmacéutica de acuerdo con la presente invención puede dar como resultado la inhibición de una reducción en, o la regeneración de, la matriz del cartílago articular y los condrocitos en la porción de la articulación afectada, e inhibir los cambios degenerativos en el cartílago articular y la hinchazón en la porción articular, lo que da como resultado la inhibición o la reducción de las enfermedades artríticas. En particular, debido a que los agentes terapéuticos para la osteoartritis de la presente invención incurrir en menos carga y dolor en el paciente en comparación con las operaciones ortopédicas convencionales, tales como la cirugía artroscópica, la sustitución por articulaciones artificiales y la osteotomía, proporcionan agentes terapéuticos superiores con una calidad de vida satisfactoria para el paciente.

El nuevo descubrimiento de que los activadores de GC-B tienen la eficacia descrita anteriormente significa que es posible inhibir la artritis y promover el crecimiento de condrocitos articulares por medio de la activación de GC-B. Por añadidura, también es posible escrutar promotores de crecimiento de condrocitos articulares y agentes terapéuticos para la artritis mediante el uso de la actividad GC-B (por ejemplo, la cantidad de GMPc intracelular producida) como indicación.

Todas las publicaciones, patentes, y solicitudes de patente citadas en la presente memoria se incorporan a la presente memoria como referencia en su totalidad.

#### Texto libre de la Lista de Secuencias

Descripción en el SEQ ID NO: 1: Se forma un enlace disulfuro entre 6-Cys y 22-Cys.

Descripción en el SEQ ID NO: 2: Se forma un enlace disulfuro entre 37-Cys y 53-Cys.

Descripción de la secuencia artificial en el derivado de CNP-22 del SEQ ID NO: 3, en el que se forma un enlace disulfuro entre 6-Cys y 22-Cys.

Descripción de la secuencia artificial en el derivado de CNP-22 del SEQ ID NO: 4, en el que se forma un enlace disulfuro entre 6-Cys y 22-Cys.

Descripción de la secuencia artificial en el derivado de CNP-22 del SEQ ID NO: 5, en el que se forma un enlace disulfuro entre 6-Cys y 22-Cys.

Descripción de la secuencia artificial en el derivado de CNP-22 del SEQ ID NO: 6, en el que se forma un enlace disulfuro entre 1-Cys y 17-Cys.

Descripción de la secuencia artificial en el derivado de CNP-22 del SEQ ID NO: 7, en el que se forma un enlace disulfuro entre 7-Cys y 23-Cys.

Descripción de la secuencia artificial en el derivado de CNP-22 del SEQ ID NO: 8, en el que se forma un enlace disulfuro entre 6-Cys y 22-Cys.

Descripción de la secuencia artificial en el derivado de CNP-22 del SEQ ID NO: 9, en el que se forma un enlace disulfuro entre 1-Cys y 17-Cys.

Descripción de la secuencia artificial en el derivado de CNP-22 del SEQ ID NO: 10, en el que 4-Xaa=Leu, Ile, Val; 5-Xaa=Lys, Leu, Met; 6-Xaa=Leu, Ile, Ala, Val; 11-Xaa=Ser, Ala, Gly, Thr, Asn; 12-Xaa=Met, Ala, Trp, His, Lys, Ser, Gly; 14-Xaa=Gly, Lys, Ala, Leu; 15-Xaa=Leu, Met y en el que se forma un enlace disulfuro entre 1-Cys y 17-Cys.

#### LISTA DE SECUENCIAS

<110> Nakao, Kazuwa CHUGAI SEIYAKU KABUSHIKI KAISHA

<120> Agente para el tratamiento o la prevención de la artritis

<130> PH-2442-PCT

<150> JP 2004-107924

<151> 2004-03-31

<160> 10

<170> PatentIn Ver. 2. 1

<210> 1

<211> 22

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220>

<223> Descripción: Se forma un enlace disulfuro entre 6-Cys y 22-Cys

<400> 1

**Gly Leu Ser Lys Gly Cys Phe Gly Leu Lys Leu Asp Arg Ile Gly Ser**

**1**

**5**

**10**

**15**

**Met Ser Gly Leu Gly Cys**

**20**

5

<210> 2

<211> 53

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220>

10 <223> Descripción: Se forma un enlace disulfuro entre 37-Cys y 53-Cys

<400> 2

**Asp Leu Arg Val Asp Thr Lys Ser Arg Ala Ala Trp Ala Arg Leu Leu**

**1**

**5**

**10**

**15**

**Gln Glu His Pro Asn Ala Arg Lys Tyr Lys Gly Ala Asn Lys Lys Gly**

**20**

**25**

**30**

**Leu Ser Lys Gly Cys Phe Gly Leu Lys Leu Asp Arg Ile Gly Ser Met**

**35**

**40**

**45**

**Ser Gly Leu Gly Cys**

**50**

<210> 3

<211> 22

15 <212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Descripción de la Secuencia Artificial: derivado de CNP-22, en el que se forma un enlace disulfuro entre 6-Cys y 22-Cys

20 <400> 3

**Gly Leu Ser Lys Gly Cys Phe Gly Leu Lys Leu Asp Arg Ile Gly Ala**

**1**

**5**

**10**

**15**

**Met Ser Gly Leu Gly Cys**

**20**

<210> 4

<211> 22

<212> PRT

25 <213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Descripción de la Secuencia Artificial: derivado de CNP-22, en el que se forma un enlace disulfuro entre 6-Cys y 22-Cys

<400> 4

**Gly Leu Ser Lys Gly Cys Phe Gly Leu Lys Leu Asp Arg Ile Gly Ser**

**1 5 10 15**

**Gln Ser Gly Leu Gly Cys**

**20**

<210> 5

<211> 22

<212> PRT

5 <213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Descripción de la Secuencia Artificial: derivado de CNP-22, en el que se forma un enlace disulfuro entre 6-Cys y 22-Cys

<400> 5

**Gly Leu Ser Lys Gly Cys Phe Gly Leu Lys Leu Asp Arg Ile Gly Ser**

**1 5 10 15**

**Ala Ser Gly Leu Gly Cys**

**20**

<210> 6

<211> 17

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

15 <220>

<223> Descripción de la Secuencia Artificial: derivado de CNP-22, en el que se forma un enlace disulfuro entre 1-Cys y 17-Cys

<400> 6

**Cys Phe Gly Leu Lys Leu Asp Arg Ile Gly Ser Met Ser Gly Leu Gly**

**1 5 10 15**

**Cys**

20 <210> 7

<211> 23

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

25 <223> Descripción de la Secuencia Artificial: derivado de CNP-22, en el que se forma un enlace disulfuro entre 7-Cys y 23-Cys

<400> 7

**Ser Leu Arg Arg Ser Ser Cys Phe Gly Leu Lys Leu Asp Arg Ile Gly**

**1 5 10 15**

**Ser Met Ser Gly Leu Gly Cys**

**20**

<210> 8

30 <211> 27

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

35 <223> Descripción de la Secuencia Artificial: derivado de CNP-22, en el que se forma un enlace disulfuro entre 6-Cys y 22-Cys

<400> 8

**Gly Leu Ser Lys Gly Cys Phe Gly Leu Lys Leu Asp Arg Ile Gly Ser**

**1 5 10 15**

**Met Ser Gly Leu Gly Cys Asn Ser Phe Arg Tyr**

**20 25**

<210> 9

<211> 22

<212> PRT

5 <213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Descripción de la Secuencia Artificial: derivado de CNP-22, en el que se forma un enlace disulfuro entre 1-Cys y 17-Cys

<400> 9

**Cys Phe Gly Leu Lys Leu Asp Arg Ile Gly Ser Gln Ser Gly Leu Gly**

**1 5 10 15**

**Cys Asn Ser Phe Arg Tyr**

**20**

10

<210> 10

<211> 17

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

15

<220>

<223> Descripción de la Secuencia Artificial: derivado de CNP-22, en el que 4-Xaa=Leu, Ile, Val; 5-Xaa=Lys, Leu, Met; 6-Xaa=Leu, Ile, Ala, Val; 11-Xaa=Ser, Ala, Gly, Thr, Asn; 12-Xaa=Met, Ala, Trp, His, Lys, Ser, Gly; 14-Xaa=Gly, Lys, Ala, Leu; 15-Xaa=Leu, Met y en el que se forma un enlace disulfuro entre 1-Cys y 17-Cys

<400> 10

**Cys Phe Gly Xaa Xaa Xaa Asp Arg Ile Gly Xaa Xaa Ser Xaa Xaa Gly**

**1 5 10 15**

20

**Cys**

## REIVINDICACIONES

1. Una composición farmacéutica que comprende un activador de la guanil ciclasa B (GC-B) para su uso en
  - (a) la inhibición de la artritis, en donde la artritis es inhibida mediante la activación de GC-B; o
  - (b) la inhibición de la degeneración del cartílago articular en la osteoartritis mediante el aumento del crecimiento de los condrocitos articulares, en donde dicho crecimiento se incrementa mediante la activación de GC-B, en donde el activador de GC-B es un péptido natriurético tipo C (CNP) o un derivado del mismo, en donde el CNP se selecciona del grupo que consiste en CNP-22 del SEQ ID NO: 1 y CNP-53 del SEQ ID NO: 2, y en donde el derivado se selecciona del grupo que consiste en un péptido activador de GC-B que tiene la secuencia de aminoácidos del SEQ ID NO: 1 en la que de 1 a 10 aminoácidos son sustituidos, suprimidos, o añadidos y que tiene una actividad de activación de GC-B y un péptido activador de GC-B que tiene la secuencia de aminoácidos del SEQ ID NO: 2 en la que los aminoácidos 1 a 10 son sustituidos, suprimidos, o añadidos y que tiene una actividad de activación de GC-B.
2. El uso de un activador de la guanil ciclasa B (GC-B) para la preparación de una composición farmacéutica para
  - (a) la inhibición de la artritis, en donde la artritis es inhibida mediante la activación de GC-B; o
  - (b) la inhibición de la degeneración de cartílago articular en la osteoartritis mediante el aumento del crecimiento de los condrocitos articulares, en donde dicho crecimiento se incrementa mediante la activación de GC-B, en donde el activador de GC-B es un péptido natriurético tipo C (CNP) o un derivado del mismo, en donde el CNP se selecciona del grupo que consiste en CNP-22 del SEQ ID NO: 1 y CNP-53 del SEQ ID NO: 2, y en donde el derivado se selecciona del grupo que consiste en un péptido activador de GC-B que tiene la secuencia de aminoácidos del SEQ ID NO: 1 en la que de 1 a 10 aminoácidos son sustituidos, suprimidos, o añadidos y que tiene una actividad de activación de GC-B y un péptido activador de GC-B que tiene la secuencia de aminoácidos del SEQ ID NO: 2 en la que de 1 a 10 aminoácidos son sustituidos, suprimidos, o añadidos y que tiene una actividad de activación de GC-B.
3. La composición farmacéutica de la reivindicación 1 o el uso de la reivindicación 2, en donde el activador de GC-B es una combinación de un CNP o un derivado del mismo como se define en la reivindicación 1 o 2 y al menos un fármaco antiinflamatorio no esteroideo.
4. La composición farmacéutica o el uso de la reivindicación 3, en donde el fármaco antiinflamatorio no esteroideo es un inhibidor de la ciclooxigenasa.
5. Una combinación de un activador de GC-B y un inhibidor de la ciclooxigenasa para su uso en la inhibición de la artritis, en donde la artritis es inhibida mediante la activación de GC-B y en donde el activador de GC-B es un péptido natriurético tipo C (CNP) o un derivado del mismo, en donde el CNP se selecciona del grupo que consiste en CNP-22 del SEQ ID NO: 1 y CNP-53 del SEQ ID NO: 2, y en donde el derivado se selecciona del grupo que consiste en un péptido activador de GC-B que tiene la secuencia de aminoácidos del SEQ ID NO: 1 en la que de 1 a 10 aminoácidos son sustituidos, suprimidos, o añadidos y que tiene una actividad de activación de GC-B y un péptido activador de GC-B que tiene la secuencia de aminoácidos del SEQ ID NO: 2 en la que de 1 a 10 aminoácidos son sustituidos, suprimidos, o añadidos y que tiene una actividad de activación de GC-B.
6. La composición farmacéutica de la reivindicación 4, el uso de la reivindicación 4, o la combinación de la reivindicación 5, en donde el inhibidor de la ciclooxigenasa se selecciona del grupo que consiste en indometacina, ibuprofeno, piroxicam, ácido salicílico, diclofenaco, cetoprofeno, y naproxeno.
7. La composición farmacéutica de la reivindicación 1, 3, 4 o 6, el uso de una cualquiera de las reivindicaciones 2 a 4 o 6, o la combinación de la reivindicación 5 o 6, en donde la artritis es la osteoartritis.
8. La composición farmacéutica, el uso o la combinación de la reivindicación 7, en donde la osteoartritis es osteoartritis de articulaciones que cargan peso o articulaciones que no cargan peso.
9. La composición farmacéutica, el uso o la combinación de la reivindicación 8, en donde la osteoartritis es
  - (a) gonartrosis degenerativa;
  - (b) coxartrosis degenerativa; o
  - (c) artrosis temporomandibular.
10. La composición farmacéutica de la reivindicación 1, 3, 4 o 6, el uso de una cualquiera de las reivindicaciones 2 a 4 o 6, o la combinación de la reivindicación 5 o 6, en donde la artritis está causada por
  - (a) artritis reumatoide; o
  - (b) osteoartritis.
11. Un método para escrutar un promotor del crecimiento de condrocitos articulares, que comprende
  - (a) preparar células cultivadas que expresan GC-B o células de condrocitos articulares;
  - (b) cultivar las células en presencia de un agente candidato; y

(c) escrutar los agentes candidatos para determinar la capacidad de promover el crecimiento de condrocitos articulares utilizando como indicación la diferencia entre la actividad de GC-B celular en presencia y ausencia del agente candidato.

5 12. El método de la reivindicación 11, en donde la actividad GC-B se determina como una cantidad de GMPc intracelular producido.

13. Un método para escrutar un promotor del crecimiento de condrocitos articulares que comprende

- 10 (a) preparar una línea celular cultivada que ha sido forzada a expresar GC-B;  
(b) cultivar la línea celular en presencia o ausencia de un agente candidato;  
(c) determinar la cantidad de GMPc intracelular producido; y  
(d) escrutar los agentes candidatos para determinar la capacidad de promover el crecimiento de condrocitos articulares utilizando como indicación las cantidades de GMPc intracelular producido en presencia y ausencia del agente candidato.

15 14. Un método para escrutar un agente terapéutico para la osteoartritis, la artritis reumatoide u otra artritis que comprende

- 20 (a) preparar células cultivadas que expresan GC-B, o células de condrocitos articulares;  
(b) cultivar las células en presencia de un agente candidato; y  
(c) escrutar los agentes candidatos para determinar un agente capaz de tratar la osteoartritis, la artritis reumatoide u otra artritis utilizando como indicación la diferencia entre la actividad de GC-B celular en presencia o ausencia de un agente candidato.

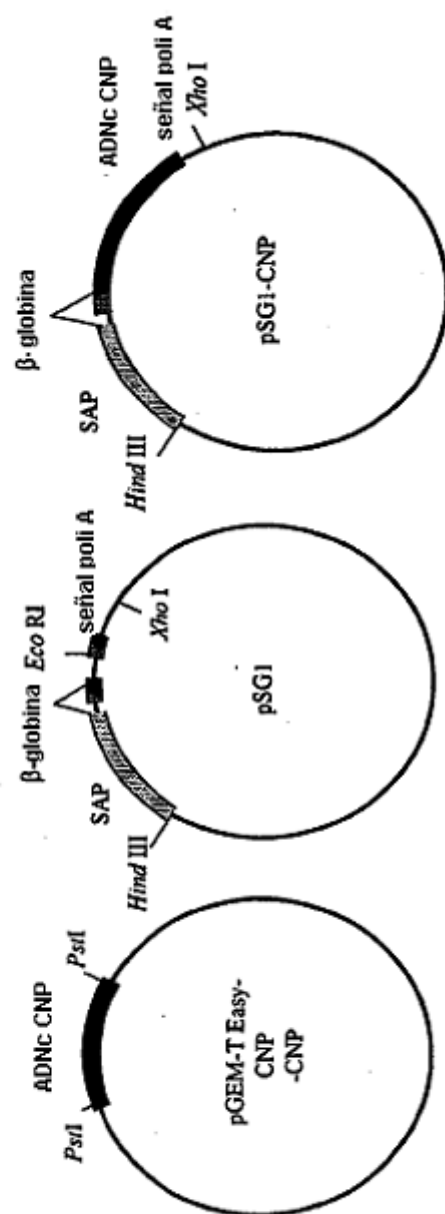
25 15. El método de la reivindicación 14, en donde la actividad GC-B se determina como una cantidad de GMPc intracelular producido.

16. Un método para escrutar un agente terapéutico para la osteoartritis, la artritis reumatoide u otra artritis, que comprende

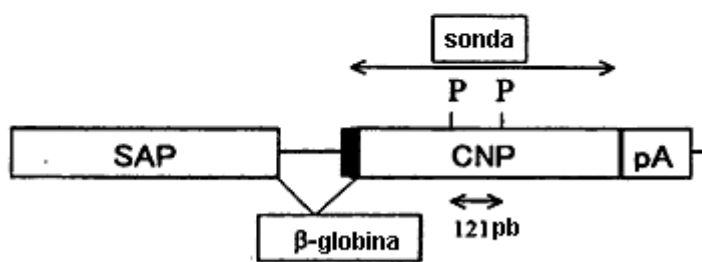
- 30 (a) preparar una línea celular cultivada que ha sido forzada a expresar GC-B;  
(b) cultivar la línea celular en presencia o ausencia de un agente candidato;  
(c) determinar la cantidad de GMPc intracelular producido; y  
(d) escrutar los agentes candidatos a un agente capaz de tratar la osteoartritis, la artritis reumatoide u otra artritis utilizando como indicación la diferencia entre las cantidades de GMPc intracelular producido en presencia y ausencia del agente candidato.

35

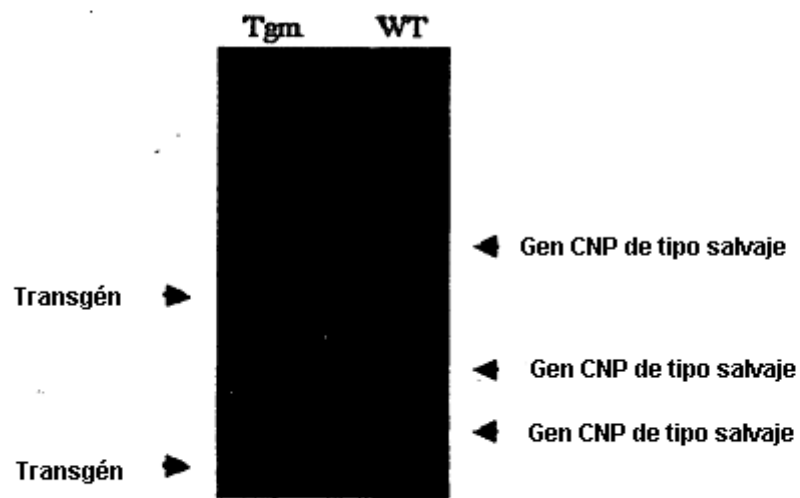
Figura 1A      Figura 1B      Figura 1C



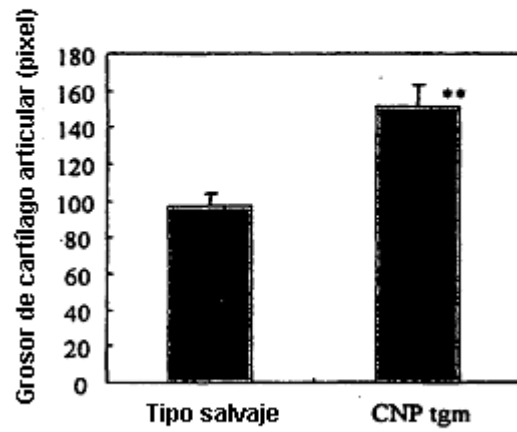
**Figura 2**



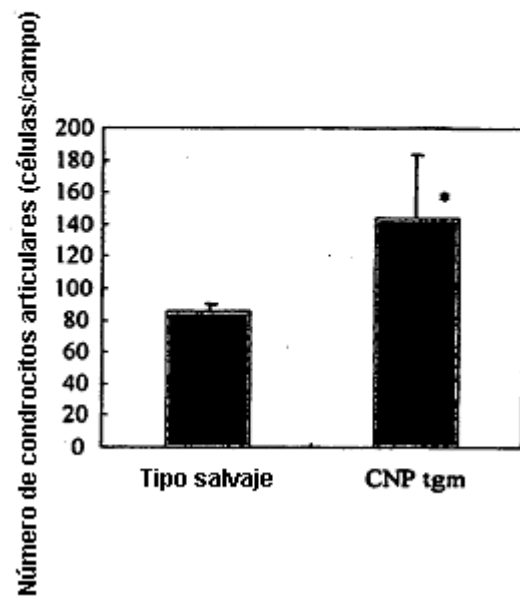
**Figura 3**



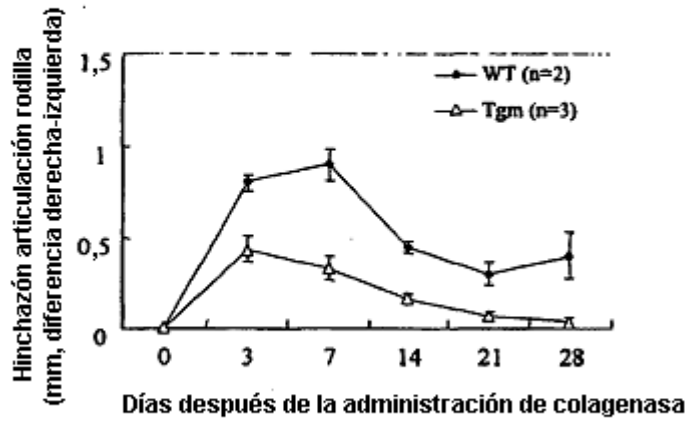
**Figura 4**



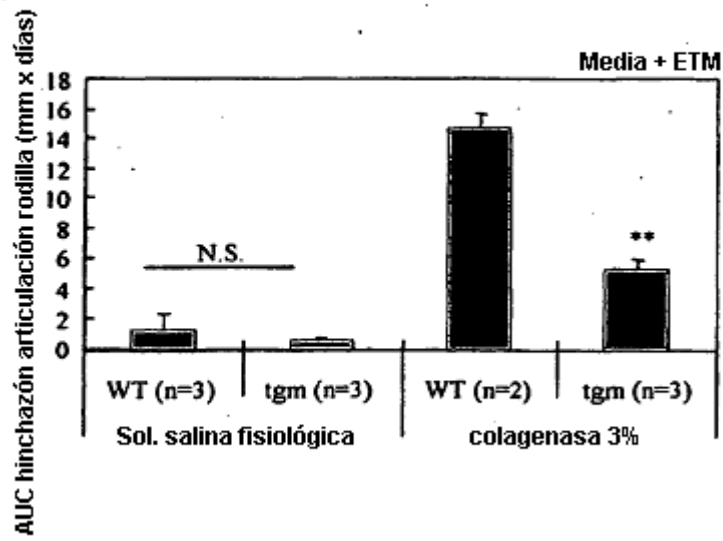
**Figura 5**



**Figura 6A**



**Figura 6B**



### **Figura 7A**

Tejido sinovial normal



### **Figura 7B**

Colagenasa 3%, tipo salvaje



### **Figura 7C**

Colagenasa 3%  
Ratón transgénico para CNP tgm cepa #17



### **Figura 8A**

Cartilago articular normal



### **Figura 8B**

Colagenasa 3%, tipo salvaje

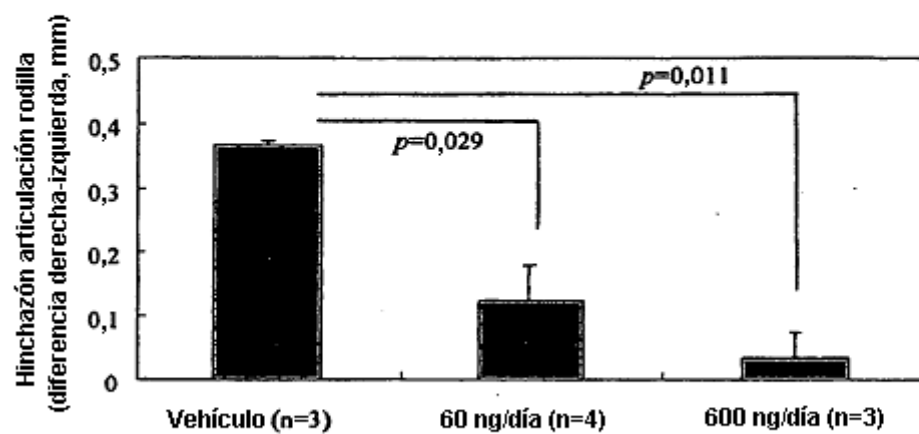


### **Figura 8C**

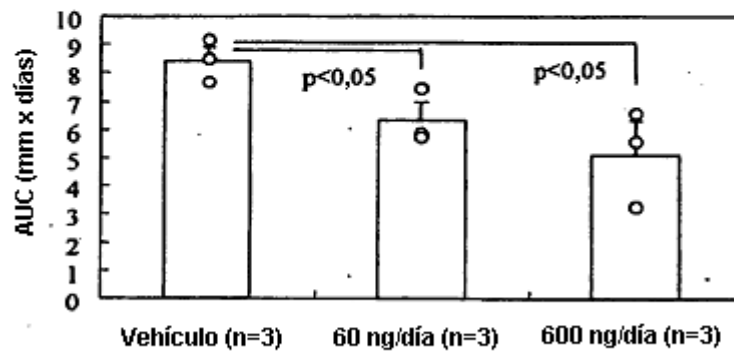
Colagenasa 3%  
Ratón transgénico para CNP tgm cepa #17



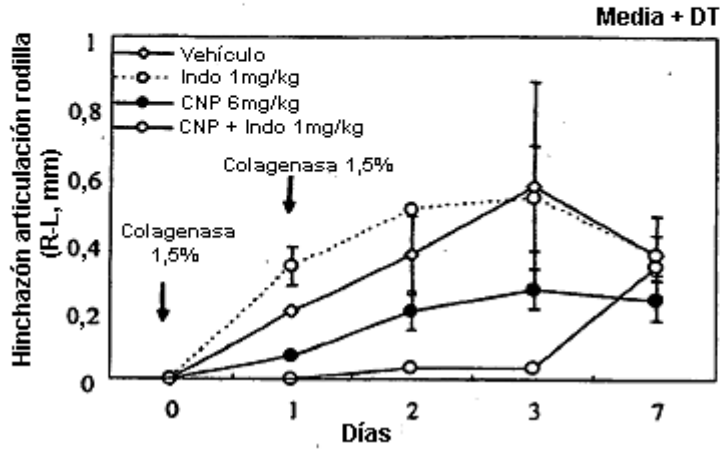
**Figura 9**



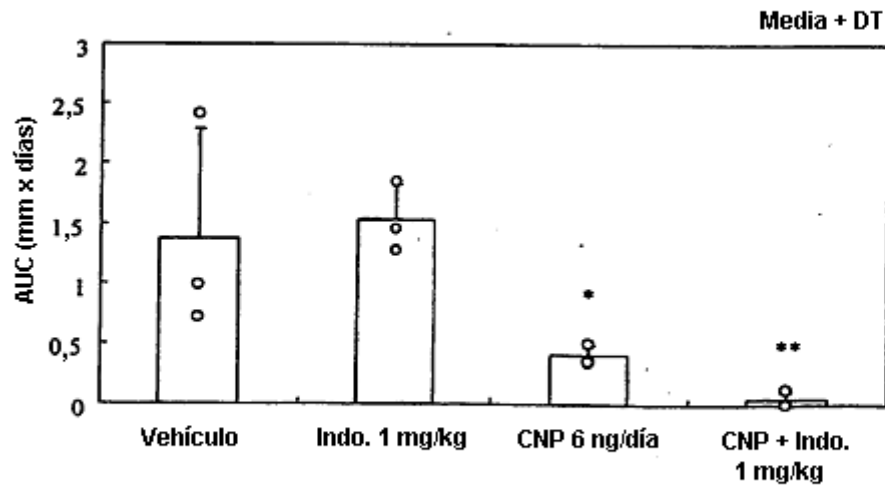
**Figura 10**

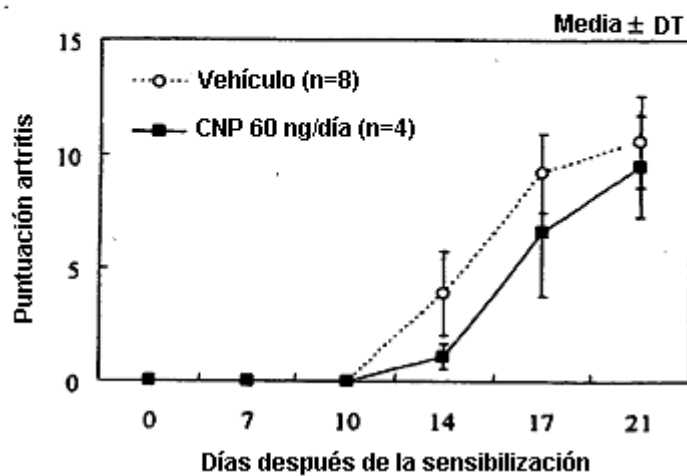
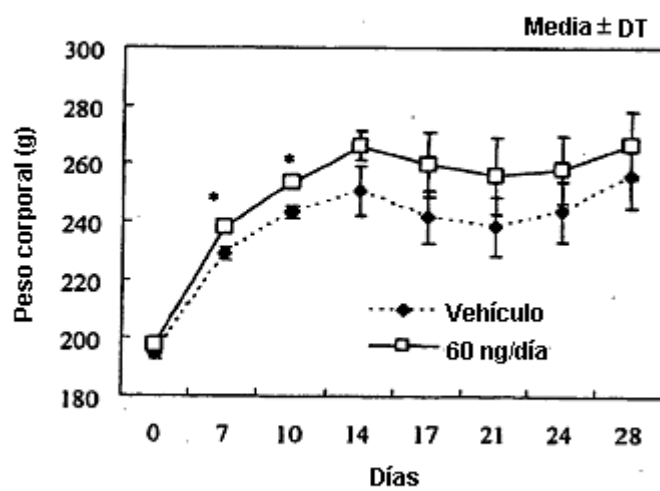


**Figura 11A**



**Figura 11B**



**Figura 12A****Figura 12B**

**Figura 13**

