

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 493 840**

51 Int. Cl.:

A61K 31/728 (2006.01)

A61K 31/717 (2006.01)

A61K 38/18 (2006.01)

C07K 14/50 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **07.10.2003 E 03773163 (5)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **25.06.2014 EP 1551426**

54 Título: **Procedimiento de administración de FGF-18**

30 Prioridad:

07.10.2002 US 416670 P

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

12.09.2014

73 Titular/es:

**ZYMOGENETICS, INC. (100.0%)
1201 Eastlake Avenue East
Seattle, WA 98102, US**

72 Inventor/es:

ELLSWORTH, JEFF L.

74 Agente/Representante:

CARPINTERO LÓPEZ, Mario

ES 2 493 840 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

Procedimiento de administración de FGF-18.

5 **Antecedentes de la invención**

La familia del factor de crecimiento de fibroblastos (FGF) consiste en al menos veintitrés miembros distintos (Basilico y col., Adv. Cancer Res. 59, 115-165, 1992 y Fernig y col. Prog Growth Factor Res. 5(4):353-377, 1994) que generalmente actúan como mitógenos para un amplio espectro de tipos celulares. FGF 18 se ha identificado como un miembro de la familia de FGF que se ha relacionado de la manera más estrecha con FGF18 y FGF17. Las actividades asociadas a FGF18 incluyeron las simulaciones de las células de linaje mesenquimal, en particular los miocitos cardíacos, osteoblastos y condrocitos (patente de EE.UU. N.º. 6.352.971). FGF18 tiene enlaces y activa FGF4 y las variantes de empalme "IIIc" de FGFR3 y FGFR2. Se ha comprobado que FGFR3 juega un papel en el crecimiento óseo. Los ratones convertidos por completo en homocigóticos para FGFR3(-/-) dieron lugar a anomalías esqueléticas después del nacimiento (Colvin y col, Nature Genet. 12:309-397, 1996 y Deng y col., Cell 84:911-921, 1996). El fenotipo mutante sugiere que en ratones normales, FGFR-3 juega un papel en la regulación de la división celular del condrocito en el crecimiento de la región de placa del hueso (Goldfarb, Cytokine and Growth Factor Rev. 7(4):311-325, 1996). También se han encontrado mutaciones del receptor FGF en síndromes de condrodisplasia y craniosinostosis (Omitz y Marie, Genes and Development 16: 1446-1465, 2002).

La remodelación ósea es el proceso dinámico por el cual se mantienen la masa tisular y la arquitectura del esqueleto. El proceso es un equilibrio entre la resorción ósea y la formación ósea, siendo dos tipos de células las consideradas como los agentes principales. Estas células son los osteoblastos y los osteoclastos. Los osteoblastos sintetizan y depositan matriz para generar nuevo hueso. Las actividades de los osteoblastos y osteoclastos se regulan por medio de muchos factores, sistémicos y locales, que incluyen factores de crecimiento.

Cuando la resorción ósea supera a la formación ósea, tiene lugar una pérdida neta de hueso, y aumenta la propensión a fracturas. Una menor formación ósea está asociada al envejecimiento y determinados estados de patologías. Solo en Estados Unidos, existen aproximadamente 1,5 millones de fracturas al año, que se atribuyen a la osteoporosis. El impacto de estas fracturas sobre la calidad de vida del paciente es enorme. Se estima que los costes asociados al sistema sanitario de Estados Unidos son de 5-10 millones de dólares al año, excluyendo los costes a largo plazo.

Otras aplicaciones terapéuticas para los factores de crecimiento que influyen en la remodelación ósea incluyen, por ejemplo, el tratamiento de lesiones que requieren la proliferación de osteoblastos para la curación, tales como fracturas, así como la estimulación de la proliferación de células mesenquimales y la síntesis de hueso intramembranoso que se han indicado como aspectos de la reparación de fracturas (Joyce y col., 36º Annual Meeting, Orthopaedic Research Society, Febrero 5-8, 1990, Nueva Orleans, LA).

La sustitución del cartílago articular dañado provocado por lesión o enfermedad es un reto principal para los médicos, y los tratamientos disponibles se consideran impredecibles y eficaces únicamente durante un tiempo limitado. Final y actualmente todos los tratamientos disponibles para el daño del cartílago están basados en el alivio del dolor, con escaso o nulo énfasis en la regeneración de los tejidos dañados. Por tanto, la mayoría de los pacientes jóvenes no buscan un tratamiento o se les aconseja posponer el tratamiento durante el mayor tiempo posible. Cuando se requiere el tratamiento, el procedimiento convencional es una sustitución total de la articulación o microfractura, un procedimiento que implica la penetración del hueso sub-condral para estimular la deposición de fibro-cartílago por parte de los condrocitos. Aunque la deposición de fibro-cartílago no es un equivalente funcional del cartílago articular, actualmente es el mejor tratamiento disponible debido a que se ha logrado escaso éxito en la sustitución del cartílago articular. Se están investigando dos enfoques para estimular la deposición de cartílago articular: estimulación de la *actividad* del condrocito *in vivo* y expansión *ex vivo* de los condrocitos y sus progenitores para el trasplante (Jackson y col, Arthroscopy: The J. of Arthroscopy and Related Surg. 12:732-738, 1996). Además, la regeneración o reparación del cartílago elástico es apreciable para el tratamiento de lesiones y defectos en oído y nariz. Cualquier factor de crecimiento con especificidad por las células de linaje de condrocito que estimule la proliferación de las mismas, diferenciación o inducción de la producción de cartílago será apreciable para mantener, reparar o sustituir el cartílago articular.

Generalmente, la administración de proteínas requiere una formulación que prolongue la semivida o la actividad biológica de la proteína activa aumentando la resistencia a la degradación proteolítica o la agregación. El suministro de una composición terapéutica proteínica también puede resultar difícil cuando el sitio de acción terapéutica se limita preferentemente a una ubicación específica en el cuerpo. La presente invención proporciona formulaciones de FGF18 que son más fáciles de administrar y más eficaces, y otros usos que deberían resultar evidentes para los expertos en la técnica a partir de las consideraciones de la presente memoria.

El documento WO 00/78356 describe conjugados de polisacáridos inyectables de hialuronato-sulfatado. Shimoaka T y col., JBC, 1 de marzo de 2002, Vol. 277 (9), páginas 7493-7500, describe la regulación de funciones

de osteoblastos, condrocitos y osteoclastos por parte de FGF18 en comparación con FGF2 y FGF10.

Ellsworth JL y col., *Osteoarthritis and Cartilage*, Vol. 10(4), 1 de abril 2002, páginas 308-320, presenta que FGF18 es un factor trófico para condrocitos maduros y sus progenitores.

5 El documento US 6221854 describe un procedimiento para promover el crecimiento óseo con ácido hialurónico y factores de crecimiento.

10 El documento WO 01/78682 describe composiciones de fármaco de liberación prolongada.

El documento WO 98/16644 describe homólogos de FGF.

Antes de explicar la invención con detalle, puede resultar útil para su comprensión la definición de los siguientes términos:

15 La expresión “cola de afinidad”, según se usa en la presente memoria, indica un segmento de polipéptido que se puede unir a un segundo polipéptido para la purificación o detección del segundo polipéptido o para proporcionar sitios para la unión del segundo polipéptido a un sustrato. Principalmente, se puede usar cualquier péptido y/o proteínas para el cual se encuentre disponible un anticuerpo o agente de unión específico, como cola de afinidad. Las colas de afinidad incluyen una proteína A de tracto de poli-histidina (Nilsson y col., *EMBO. J.* 4:1075, 1985; Nilsson y col., *Methods Enzymol*, 198:3, 1991), glutatión S transferasa (Smith y Johnson, *Gene* 67:31, 1988), cola de afinidad Glu-Glu (Grussenmeyer y col., *Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU* 82:7952-4, 1985), sustancia P, péptido Flag™ (Hopp y col., *Biotechnology* 6: 1204-10, 1988), péptido de unión a estreptavidina, u otro epítipo antigénico o dominio de unión. Véase, en general, Ford y col., *Protein Expression and Purification* 2: 95-107, 1991. Las colas de afinidad que codifican ADN se encuentran disponibles a partir de suministradores comerciales (por ejemplo, Pharmacia Biotech, Piscataway, NJ).

30 La expresión “variante alélica”, según se usa en la presente memoria, indica cualquiera de las dos o más formas alternativas de un gen que ocupa el mismo locus cromosómico. La variación alélica surge de forma natural a través de mutación, y puede ser el resultado de polimorfismo fenotípico dentro de las poblaciones. Las mutaciones génicas pueden ser silentes (sin cambio en el polipéptido codificado) o pueden codificar polipéptidos que tienen la secuencia de amino ácidos alterada. La expresión variante alélica también se usa en la presente memoria para indicar una proteína codificada por una variante alélica de un gen.

35 Los términos “amino-terminal” y “carboxilo-terminal”, según se usan en la presente memoria, indican posiciones dentro de los polipéptidos. Cuando el contexto lo permite, estos términos se usan con referencia a una secuencia particular o parte de un polipéptido para indicar proximidad o posición relativa. Por ejemplo, una secuencia determinada ubicada en carboxilo-terminal con respecto a una secuencia dentro de un polipéptido se encuentra ubicada en posición próxima al extremo de carboxilo de la secuencia de referencia, pero no necesariamente en el extremo de carboxilo del polipéptido completo.

45 La expresión “ácido hialurónico”, según se usa en la presente memoria, incluye derivados de ácido hialurónico que incluyen ésteres de ácido hialurónico, sales de ácido hialurónico y también incluye el término hialuronano. La designación también incluye formas de peso molecular tanto bajo como elevado y hialuronanos reticulados o hilanos. Ejemplos de dichos hialuronanos son Synvisc® (Genzyme Corp., Cambridge, MA), ORTHOVISC® (Anika Therapeutics, Woburn, MA) y HYALGAN® (Sanofi-Syntehlabo, Inc., Malvern, PA).

50 El término “aislado”, cuando se aplica a un polinucleótido, indica que el polinucleótido se ha retirado de su medio genético natural y, de este modo, se encuentra libre de otras secuencias de codificación extrañas o no deseadas, y está en forma apropiada para su uso dentro de sistemas de producción de proteínas sometidas a estudio técnico genético. Dichas moléculas aisladas son aquellas que se separan a partir de su entorno natural e incluyen ADNc y clones genómicos. Las moléculas de ADN aisladas de la presente invención se encuentran libres de otros genes a los cuales se asocian de manera común, pero pueden incluir las regiones 5' y 3' no sometidas a translación, de origen natural, tales como promotores y agentes de terminación. La identificación de las regiones asociadas resultará evidente para el experto en la técnica (véase por ejemplo, Dynan y Tijan, *Nature* 316:774-78, 1985).

60 Un polipéptido o proteína “aislada” es un polipéptido o proteína que se descubre en una condición diferente de su entorno natural, tal como a partir de sangre y un tejido animal. En una forma preferida, el polipéptido aislado está sustancialmente libre de otros polipéptidos, en particular de otros polipéptidos de origen animal. Es preferible proporcionar los polipéptidos en una forma altamente pura, es decir, mayor que un 95 % de pureza, más preferentemente mayor que un 99 % de pureza. Cuando se usa en este contexto, el término “aislado” no excluye la presencia del mismo polipéptido en formas físicas alternativas, tales como dímeros o formas alternativas glucosiladas o derivatizadas.

65 El término “homólogo” indica un polipéptido o proteína obtenidos a partir de una especie que es la contra-parte

funcional de un polipéptido o proteína a partir de especies diferentes. Las diferencias de secuencia entre ortólogos son el resultado de la especiación.

5 Un "polinucleótido" es un polímero de hebra individual o doble de bases de desoxirribonucleótido o ribonucleótido que se lee a partir del extremo 5' al extremo 3'. Los polinucleótidos incluyen ARN y ADN, y se pueden aislar a partir de fuentes naturales, se pueden sintetizar *in vitro*, o se pueden preparar a partir de moléculas naturales o sintéticas. Los tamaños de los polinucleótidos se expresan como pares de bases (abreviado "bp"), nucleótidos ("nt") o kilobases ("kb"). Cuando el contexto lo permite, los dos últimos términos pueden describir polinucleótidos que tienen hebra individual o hebra doble. Cuando el término se aplica a moléculas de doble hebra, se usa para indicar la longitud total y se entiende que es equivalente a la expresión "pares de bases". Se reconoce por parte de los expertos en la técnica que las dos hebras de un polinucleótido de doble hebra pueden diferir ligeramente en cuanto a su longitud y que sus extremos pueden estar escalonados como consecuencia de la escisión enzimática; de este modo, puede ocurrir que no todos los nucleótidos de una molécula de polinucleótido de doble hebra se encuentren apareados. Dichos extremos que no están apareados, en general, no superan 20 nt de longitud.

15 Un "polipéptido" es un polímero de residuos de aminoácido unidos por medio de enlaces de péptido, producidos por vía natural o sintética. Los polipéptidos de menos de aproximadamente 10 residuos de amino ácido se denominan comúnmente "péptidos".

20 El término "promotor", según se usa en la presente memoria para su significado reconocido en la técnica, indica una parte de un gen que contiene secuencias de ADN, que proporciona la unión de la ARN polimerasa y el inicio de la transcripción. Las secuencias de promotor se encuentran comúnmente, pero no siempre, en las regiones de los genes que no son de codificación 5'.

25 Una "proteína" es una macromolécula que comprende una o más cadenas de polipéptido. Una proteína también puede comprender componentes que no sean peptídicos, tales como grupos carbohidrato. Los carbohidratos y otros sustituyentes no peptídicos se pueden añadir a la proteína por medio de una célula en la cual se produce la proteína, y varían con el tipo de célula. Las proteínas se definen en la presente memoria en términos de sus estructuras de esqueleto de amino ácidos; los sustituyentes tales como grupos de hidratos de carbono no están especificados de forma general, pero no obstante pueden estar presentes.

30 El término "receptor" indica una proteína asociada a célula que se une a una molécula bioactiva (es decir, un ligando) y media en el efecto del ligando sobre la célula. Los receptores de unión a membrana se caracterizan por una estructura de multi-péptido que comprende un dominio extracelular de unión a ligando y un dominio de efector intracelular que normalmente se encuentra implicado en la transducción de señales. La unión de un ligando a un receptor tiene como resultado un cambio conformacional en el receptor que provoca una interacción entre el dominio de efector y la(s) otra(s) molécula(s) de la célula. Esta interacción, a su vez, conduce a una alteración del metabolismo de la célula. Los episodios metabólicos que están ligados a las interacciones receptor-ligando incluyen la transcripción génica, la fosforilación, desfosforilación, aumentos en la producción de AMP, movilización del calcio celular, movilización de los lípidos de la membrana, adhesión celular, hidrólisis de lípidos de inositol e hidrólisis de fosfolípidos. En general, los receptores pueden estar unidos a la membrana, ser citosólicos o nucleares; monoméricos (por ejemplo, receptor de hormona estimuladora de tiroides, receptor beta-adrenérgico), o multiméricos (por ejemplo, receptor PDGF, receptor de hormona del crecimiento, receptor IL-3, receptor GM-CSF, receptor G-CSF, receptor de eritropoyetina y receptor IL-6).

45 La expresión "secuencia de señal secretora" indica una secuencia de ADN que codifica un polipéptido (un "péptido secretor") que, como componente de un polipéptido más grande, dirige el polipéptido más grande a través de un mecanismo secretor de las células en la cual se sintetiza. El polipéptido de mayor tamaño experimenta escisión para retirar el péptido secretor durante el tránsito a través del mecanismo secretor.

50 Se comprende que los pesos moleculares y las longitudes de los polímeros determinados por medio de procedimientos analíticos imprecisos (por ejemplo, electroforesis de gel) son valores aproximados. Cuando dicho valor se expresa como "aproximadamente" X o "aproximadamente" X, se comprende que el valor afirmado de X debe ser exacto en $\pm 10\%$.

55 La presente invención está basada en parte en el descubrimiento de que cuando se administran las composiciones de polipéptidos FGF18 o proteínas más un portador cargado negativamente, como se define en las reivindicaciones, a una articulación sinovial, se mejoran los efectos estimuladores de FGF18. Por tanto, la presente invención va destinada a composiciones de polipéptidos FGF18 o proteínas más portador negativamente cargado, como se define en las reivindicaciones adjuntas, para estimular la proliferación de células mesenquimales, en particular de condrocitos. Las composiciones son para administración a una articulación por vía intra-articular, que contiene líquido sinovial.

65 La secuencia de nucleótidos de ADNc FGF18 se describe en la SEC. Nº. ID. 1 y la secuencia de amino ácidos deducida se describe en la SEC. Nº. ID. 2. Originalmente, FGF18 se designó como zFGF5, y se describe por completo en las patentes de Estados Unidos comúnmente concedidas 6.352.971 y 5.989.866. El análisis de ADNc

que codifica un polipéptido FGF18 (SEC. N.º. ID 1) reveló un marco de lectura abierto que codificaba para 207 amino ácidos (SEC. N.º. ID. 2) que comprendía un polipéptido madura de 180 amino ácidos (residuo 28 a residuo 207 de la SEC. N.º. ID. 2).

- 5 Se descubrió que la secuencia de polinucleótidos FGF18 de ratón como se muestra en la SEC. N.º. ID. 3 y que corresponde a la secuencia de amino ácidos que se muestra en la SEC. N.º. ID. 4 tenía un elevado grado de homología con respecto al del ortólogo humano. A nivel de amino ácidos, los polipéptidos de ratón y humano son aproximadamente un 98 % idénticos, con tres cambios de amino ácidos. Los expertos en la técnica reconocerán que las secuencias descritas en la SEC. N.º. ID. 1 ó SEC. N.º. ID. 3 y la SEC. N.º. ID. 2 y la SEC. N.º. ID. 4 representan un alelo individual del gen PGF18 humano y de ratón y polipéptido, respectivamente, y se espera que tengan lugar la variación alélica y el proceso alternativo de corte y empalme.

15 Los miembros de la familia de FGF están caracterizados por dominios de unión a heparina. Un dominio putativo de unión a heparina para FGF18 se ha identificado en la región del residuo de amino ácido 148 (Gly) con respecto al residuo de amino ácido 169 (Gln) de la SEC. N.º. ID. 2 y la SEC. N.º. ID. 4. Se postula que la señalización mediada con receptor se inicia tras la unión del ligando FGF complejado con los proteoglicanos de sulfato de heparina de superficie celular. Se pueden colocar muchos miembros de la familia de FGF en una o dos familias relacionadas sobre la base de sus estructuras y funciones. aFGF y bFGF consisten en tres exones separados por dos intrones de longitud variable. FGF-8 consiste en cinco exones, los tres primeros corresponden al primer exón de aFGF y bFGF. 20 Todos los miembros de la familia de FGF conocida se cortan y empalman para formar polipéptidos individuales.

25 El análisis del complejo ligando-receptor de FGF18 ha demostrado que FGF18 tiene especificidad por FGFR4 y las variantes de empalme "IIIc" de FGFR3 y FGFR2. FGFR3-IIIc y FGFR2-IIIc se han identificado dentro de los condrocitos de tejido de cartílago, y en particular, se han descubierto ambos receptores en el interior de cartílago articular humano. Se han encontrado FGFR3 y FGFR2 en la placa de crecimiento de mamíferos y juegan papeles importantes en la formación de hueso endocondral e intra-membranoso. En particular, FGFR2 y FGFR3 juegan papeles importantes en el desarrollo de hueso endocondral e intra-membranoso, FGFR2 se expresa en primer lugar en la condensación de mesénquima y la expresión de FGFR3 comienza en forma de diferenciación y proliferación de condrocitos. En el desarrollo de los huesos craneales, se ha descubierto FGFR3 en la duramadre y en el periostio, 30 mientras que FGFR2 se expresa en las células de osteo-progenitor en el frente osteogénico que separa las suturas. FGFR2 también se expresa en el hueso trabecular. (Ornitz y Marie, *ibid.*, 2002). Previamente, se ha comprobado que FGF18 es un agente proliferador para condrocitos y osteoblastos, que depende por un lado del estado diferenciado de estos tipos celulares y por otro, del modo de administración. (Véase, las patentes de EE.UU. 6.352.971 y 5.989.866; Ellsworth y col., *Osteoarthritis and Cartilage*, 10:308-320, 2002; Shimoaka y col., *J. Bio. Chem.* 277 (9) 7493-500, 2002).

35 La osteoarthritis provoca dolor en las articulaciones, se piensa que viene provocada por una deficiencia en la producción de la matriz extracelular incluyendo proteoglicanos sulfatados, ácido hialurónico (HA) y colágeno de tipo II. HA es un micro-polisacárido natural de elevada viscosidad con enlaces alternantes de ácido glucurónico (1-3) y glucosaminídico (1-4). Se encuentra en el cordón umbilical, en el humor vítreo y en los líquidos sinoviales. Para su uso en los procedimientos de tratamiento y en las composiciones de la presente invención, cualquier fuente de HA es apropiada, no obstante, puede resultar preferido HA producido de forma recombinante (es decir, producido por proteínas en bacterias, levaduras o cultivos celulares de mamíferos) con respecto al aislamiento a partir de fuentes de tejidos animales o humanos, con el fin de garantizar la pureza de la composición. En el tejido conjuntivo, HA funciona como agente de enlace y protector. Se han usado fracciones de HA y las sales de HA para el tratamiento de articulaciones óseas dañadas y osteoarthritis. (Véase, la patente de Estados Unidos 5.925.626; patente de Estados Unidos 5.631.241 y el documento EP 0.939.086). HA también se usa en la visco-cirugía y visco-complementación y como coadyuvante en cirugía oftálmica.

40 HA se ha usado como componente para el tratamiento terapéutico de una variedad de trastornos, por un lado usando HA como sustancia terapéutica principal y por otro, usado como componente de una composición terapéutica útil para el tratamiento. En los experimentos llevados a cabo por otros, se usaron armazones de HA para implantar condrocitos autólogos en rodillas de pacientes, mostrando los datos mejoras sintomáticas y funcionales. Raynauld y col. (*Osteoarthritis and Cartilage*, 10(7):506-517, 2002) describen el uso de una formulación de ácido hialurónico junto con los cuidados apropiados, en la cual se mejoraron la eficacia clínica para respuestas primaria y secundaria con respecto a los cuidados solos. Generalmente, se pueden medir las respuestas primarias como cambio en el índice de osteoarthritis Wester Ontario y McMaster (WOMAC), que es una medida del dolor. La respuesta secundaria mide la discapacidad funcional y la calidad de vida auto-proporcionada. Si la respuesta terapéutica incluye un agente de modificación de la enfermedad, entonces, de igual forma, la morfología de la articulación es una variable de respuesta primaria. (Hochberg y col., *J. of Rheumatol.* 24(4): 792-794, 1997).

50 La patente de Estados Unidos 4.636.524 divulga geles reticulados de HA, solos o mezclados con otros polímeros hidrófilos y que contienen varias sustancias o sustancias de bajo peso molecular unidas de forma covalente y procesos para la preparación de los mismos. Estos productos son útiles en numerosas aplicaciones que incluyen formulaciones cosméticas y sistemas de administración de fármacos. Se conoce HA como polímero biológicamente tolerable en el sentido de que no provoca ninguna respuesta inmunológica o de otro tipo cuando se introduce en el

cuerpo humano, pudiéndose usar los geles de HA reticulados para varias aplicaciones médicas. Los geles reticulados modificados con otros polímeros o con sustancias de bajo peso molecular se pueden usar como dispositivos de administración de fármacos.

5 La patente Canadian Letters 1.240.929 muestra la combinación de compuesto de sulfato de condroitina y un hialuronato para proteger las capas celulares tanto humanas como animales y un tejido objeto de exposición a una lesión.

10 La patente de EE.UU. 4.851.521 y la solicitud de patente europea 0.265.116 describen tanto fracciones de HA como ésteres de HA reticulados. La patente de Estados Unidos 4.851.521 describe ésteres de HA incorporados a preparaciones farmacéuticas como principio activo y como vehículos para medicinas oftálmicas para uso tópico y en supositorios para efecto sistémico debido al efecto de la absorción trans-cutánea, tal como en supositorios.

15 Las patentes de Estados Unidos 6.221.854 y 5.942.499 C1 (Reexam 4806) describen el uso de HA y FGF básico (FGF-2) para el tratamiento de hueso. La patente muestra una mezcla inyectable que se administra en un sitio ortotópico o intra-óseo en el que se desea el crecimiento óseo.

20 Por el contrario, el polipéptido FGF18 y las composiciones de HA de la presente invención son útiles en un procedimiento para estimular la proliferación de condrocitos, en particular condrocitos diferenciados, capaces de inducir funciones celulares especializadas, normalmente asociadas a células diferenciadas de forma terminal. Cuando se administra localmente una composición de FGF18 y HA a un cartílago articular, se aumentó la proliferación de células y la síntesis concomitante de glucosaminoglucanos más allá de los resultados observados bien para FGF18 o bien para HA solo. Estos resultados indican que las composiciones de los polipéptidos FGF18 y HA juegan un papel terapéutico a la hora de mantener y reparar el tejido cartilaginoso, tales como articulaciones
25 dañadas por osteoartritis, artritis reumatoide o lesión traumática.

30 Se ha comprobado que FGF18 aumenta la deposición de cartílago tanto *in vivo* como *in vitro*. La generación de cartílago de hialina, cartílago elástico, y fibro-cartílago son de valor por un lado como sustancias terapéuticas y por otro, como componente para matrices biológicas. FGF18 y las composiciones de HA son útiles en el tratamiento de defectos de cartílago articular en articulaciones sinoviales que son debidos a fibrilación superficial relacionada con la edad, degeneración de cartílago debido a osteoartritis, y defectos condrales y osteocondrales focalizados debidos a lesión o enfermedad. Las composiciones de FGF18 y HA también son útiles para el tratamiento de enfermedades articulares provocadas por osteocondritis dissecans y enfermedad articular degenerativa. En el campo de la cirugía de reconstrucción y plástica, las composiciones de FGF18 y HA con útiles para la expansión de cartílago autógena o
35 alógena y la transferencia para la reconstrucción de defectos tisulares extensivos. La expansión de células y la inducción de la producción de cartílago elástico son útiles para la generación y reparación de tejido del oído y nariz.

40 Se pueden aplicar las composiciones de FGF18 por medio de inyección directa al líquido sinovial de la articulación o directamente al interior del defecto, bien solas o en forma de complejos, con un vehículo apropiado para la liberación prolongada de la proteína. No obstante, cuando se administraron polipéptido de FGF18 y HA directamente a la articulación sinovial, los efectos de las composiciones para estimular la proliferación de condrocitos superaron a los del polipéptido de FGF18 o HA solos.

45 También se puede usar FGF18 para ampliar las poblaciones de condrocitos en cultivos para el trasplante autógeno o alógeno de condrocitos y posteriormente para administrar con tratamiento concurrente que consiste en la administración de las composiciones de polipéptido de FGF18 y HA. En estos procedimientos, por ejemplo, se pueden recoger condrocitos de forma artroscópica a partir de una zona no lesionada que soporta baja carga de una articulación dañada, y se pueden someter a cultivo en presencia de composiciones de FGF18 para aumentar el número de células antes del trasplante. Posteriormente, se mezclan los cultivos ampliados con composiciones de polipéptido de FGF18 y HA, y se colocan en el espacio de la articulación o directamente en el defecto. Se pueden
50 usar las composiciones de FGF18 y HA en combinación con injertos periosteos o pericondriales que contienen células que pueden formar cartílago y/o contribuir a mantener los condrocitos trasplantados o sus células precursoras en el punto de interés. Se pueden usar las composiciones de FGF18 y HA para reparar el daño del cartílago junto con el lavado de la articulación, estimulación de médula ósea, artroplastia de abrasión, perforación subcondrial o micro-fractura del hueso sub-condrial. Adicionalmente, después del crecimiento del cartílago debido a la administración de la composición de FGF18 y HA, puede resultar necesario el tratamiento quirúrgico adicional para crear el contorno apropiado de la superficie de cartílago recién formada.

60 Las composiciones de la presente invención son útiles en un procedimiento para estimular la proliferación de condrocito y la producción de cartílago en tejidos cartilaginosos que han experimentado daño debido a lesión traumática o condropatía. De particular importancia para el tratamiento son los tejidos que exhiben superficies articuladas, tales como, columna vertebral, hombro, codo, muñeca, articulaciones de los dedos, cadera, rodilla, tobillo y articulaciones del pie. Ejemplos de trastornos que pueden beneficiarse del tratamiento incluyen osteoartritis, artritis reumatoide, otras enfermedades auto-inmunitarias u osteocondritis dessicans. Además, con frecuencia, se observa malformación de cartílago en formas de enanismo en humanos lo que sugiere que FGF18 sería útil en estos
65 pacientes.

Las composiciones de FGF18 y HA se pueden aplicar por medio de inyección directa al interior del espacio sinovial de la articulación, al interior de los tejidos próximos, o directamente al interior de un defecto de cartílago en combinación con un vehículo que exhibe una carga negativa en condiciones fisiológicas. Debido a que FGF18 tiene un punto isoeléctrico > 9,0, a un pH fisiológico, FGF18 exhibe una carga neta positiva. De este modo, las moléculas de vehículo con una abundancia de carga negativa pueden unirse a FGF18 y mejorar su actividad. Dichos vehículos incluyen hialuronanos de alto y bajo peso molecular, proteoglicanos sulfatados, tetradecasulfato de B-ciclodextrina y micro-esferas de alginato.

Para uso farmacéutico, se formulan las composiciones de la presente invención para administración intra-articular de acuerdo con procedimientos convencionales. Se determina el régimen de dosificación usando diferentes variables del paciente (por ejemplo, peso, edad, sexo), así como la presentación clínica (por ejemplo, alcance de la lesión, ubicación de la lesión, etc.). En general, las formulaciones farmacéuticas incluyen una proteína de FGF18 en combinación con un vehículo farmacéuticamente aceptable, tal como una disolución salina, una disolución salina tamponada; dextrosa de 5 % en agua o similares. Las formulaciones además pueden incluir uno o más vehículos, conservantes, agentes de solubilización, agentes tampón, albúmina para evitar la pérdida de proteínas sobre las superficies de los viales, semivida más larga, etc. El FGF18 y HA se pueden administrar por separado o en combinación en forma de composición individual. De este modo, se pueden proporcionar las formulaciones en forma de formulación individual o como estuche de multi-componente. Los procedimientos de formulación se conocen bien en la técnica y se divulgan, por ejemplo, en Remington's Pharmaceutical Sciences, Gennaro, ed., Mack Publishing Co.; Easton PA, 1990. La determinación de la dosis está dentro del nivel de experiencia en la técnica. Se pueden administrar las proteínas para el tratamiento agudo, durante una semana o menos, con frecuencia un período de uno a tres días o se puede usar en el tratamiento crónico durante varios meses o años.

En otras realizaciones, una composición farmacéutica de FGF18 y HA comprende una formulación para la liberación retardada de la proteína. Generalmente, las formulaciones de liberación retardada incluyen un dispositivo de administración monolítico que comprende soluciones bio-compatibles, geles, pastas y masillas en una matriz, en la cual se encuentra atrapada o disuelta la composición. La liberación a partir de dicha composición de liberación retardada tiene lugar por medio de difusión a través de la matriz y/o erosión de la matriz. También se puede usar un sistema de reserva, en el cual la composición farmacéutica difunde a través de una membrana.

Aunque la administración de FGF18 y HA, en una mezcla farmacéuticamente aceptable, sea suficiente para proporcionar la administración de los péptidos condrogénicos del presente procedimiento, pueden existir situaciones clínicas en las que se combinan fármacos adicionales con la mezcla. Ejemplos de otros fármacos que se pueden indicar clínicamente incluyen fármacos anti-inflamatorios tales como inhibidores de ciclooxigenasa-2 específicos y no específicos, y fármacos anti-inflamatorios esteroideos. Algunos inhibidores de COX no específicos que se podrían usar en la presente invención incluyen ácido salicílico y sus derivados, tales como aspirina o sulfasalazina, derivados de para-aminofenol, tales como acetaminofeno, indol y ácidos inden acéticos, tales como indometacina o sulindaco, ácidos arilpropiónicos, tales como ibuprofeno, naproxeno u oxaprozina, ácidos antranílicos, tales como ácido mefenámico, ácidos enólicos incluyendo oxicamas, o alcanonas tales como nabumentona. Los inhibidores específicos de COX-2 son fuanonas con sustitución de diario (Refecoxib), pirazoles con sustitución de diarilo (Celecoxib), ácidos indol acéticos (Etodolac) y sulfonalidas (Nimesulide). De manera adicional, entre los fármacos que se podrían usar, están esteroides, tales como dexametazona, prednisona, triamcinolona o metilprednisona. Otros tipos de fármacos apropiados para la presente invención serían inhibidores de la familia de factor de necrosis tumoral, tales como Enbrel o TACI-Ig, antagonistas de IL-1 tales como Kinaret, antagonistas de IL-18 e IL-15 y fármacos inmuno-depresores tales como ciclosporina. Además, se puede administrar FGF18 con inhibidores de la familia de quimocina CC (MCP-1, RANTES, MIP-alfa1 y MIP-beta 1) y CXC (IL-8 y alfa-GRO).

La invención se ilustra de manera adicional por medio de los siguientes ejemplos no limitantes.

50 Ejemplo 1

Inyección intra-articular de FGF18

Se liofilizó FGF18 y se reconstituyó a la concentración apropiada bien en PBS o bien en hialuronano de 0,5 % (0,2 um esteril filtrado). Se inyectó una dosis individual de FGF18, vehículo (PBS), hialuronano o la combinación apropiada de FGF18 disuelto bien en PBS o bien en hialuronano de un 0,5 %, presente en un volumen final de 0,5 µl, en un espacio intra-articular de gordetillo izquierdo (rodilla) de ratones c57/B16 hembra de 10 semanas de edad. Existen siete animales por grupo. Se llevaron a cabo todas las dosificaciones en condiciones de anestesia de isoflurano y se administraron 100 µl de buprenorepina tras la recuperación para analgesia. Se sacrificaron los animales 2 semanas después de la dosificación y se tomaron tejidos para histología de rutina.

Se usaron los siguientes grupos de dosis:

65

Grupo	Tratamiento
1	Sin tratamiento
2	PBS
3	5 µg de FGF18 en PBS
4	0,5 µg de FGF18 en PBS
5	0,05 µg de FGF18 en PBS
6	hialuronano 0,5 %
7	hialuronano 0,5 % + 5,0 µg de FGF18
8	hialuronano 0,5 % + 0,5 µg de FGF18
9	hialuronano 0,5 % + 0,05 µg de FGF18
10	inyección placebo

Se observó un aumento dependiente de la dosis en la formación de cartílago tras dos semanas después de la inyección de FGF18 presente en hialuronano de 0,5 %. Las dosis eficaces fueron de 0,5 y 5 µg de FGF18. La evidencia definitiva de proliferación de condrocitos se observó en 7/7 animales tratados con 5,0 µg de FGF18 en 0,5 % de hialuronano y en 3/7 ratones tratados con 0,5 µg de pericondrio, y no pareció incluir la superficie articular. Se observó proliferación de condrocito escasa o nula en cualquiera de los otros grupos. De manera importante, hialuronano sin PBS solo tuvo algunos efectos evidentes sobre la proliferación de condrocito. No hubo efectos evidentes sobre la proliferación de cartílago cuando se inyectó FGF18 en ausencia de vehículo. Estas observaciones, combinadas con las realizadas anteriormente, sugieren que las células progenitoras del pericondrio son una diana principal para FGF18. La ausencia de efecto sobre los condrocitos articulares puede ser debida al fallo de la proteína para penetrar en la superficie articular intacta debido a que FGF18 estimula el crecimiento y la síntesis de preteoglucanos de los condrocitos articulares humanos y porcinos *in vitro*.

Además, FGF18 indujo el cierre y la mineralización de la placa de crecimiento tanto en presencia como en ausencia de hialuronano; el cierre se observó en 2/4 ratones tratados con 5,0 µg de FGF18 en PBS, 2/6 ratones tratados con 0,5 µg de FGF18 en PBS y 1/7 animales tratados con 0,05 µg de FGF18 en PBS. Este efecto fue más pronunciado en presencia de hialuronano con cierre observado en 7/7 ratones tratados con 5,0 µg de FGF18 en 0,5 % de hialuronano y en 5/7 animales tratados con 0,5 µg de FGF18 en 0,5 % de hialuronano. Estos datos refuerzan la conclusión de que hialuronano mejora la actividad de FGF18.

La inflamación fue mínima y únicamente se observó con las dosis más elevadas de FGF18 junto con hialuronano. No se observó degradación de cartílago alguna, un punto importante ya que se ha presentado que bFGF tiene efectos tanto anabólicos como catabólicos sobre el cartílago.

Finalmente, no se observaron efectos sistémicos significativos de FGF18 en animales que recibieron 5 µg de FGF18 con hialuronano, bien en ubicaciones de cartílago distantes o en otros tejidos. No obstante, se observaron algunos cierres focales de la epífisis en un animal que había recibido HA solo y en un animal que había recibido 5 g de FGF18 solo. La importancia de estas observaciones no está clara por el momento.

Ejemplo 2

Tratamiento del modelo de osteoartritis

Con el fin de evaluar si FGF18 podría generar tejido condral y degeneración de cartílago inversa en una configuración de osteoartritis (OA), se indujo OA por medio de la creación de un desgarramiento meniscal en la articulación de la rodilla de ratas. En este modelo, el daño del menisco induce una generación progresiva del cartílago y la formación de osteofito que imita los cambios que tienen lugar en la osteoartritis espontánea.

Se disolvió FGF18 en un vehículo de hialuronano y se aplicó a la rodilla operada por medio de inyección intra-articular. Se evaluó la reparación de la degeneración del cartílago 3 semanas después. Se sometió a corte transversal el ligamento medio colateral de cada rata (n= 10 ratas por grupo) y se cortó el menisco medio a través del espesor completo con el fin de estimular un desgarramiento completo. Tres semanas después de la cirugía, se inyectó a las ratas, por vía intra-articular, cualquier vehículo (0,5 de hialuronano) o vehículo que contenía FGF18 humano recombinante procedente de E-coli (0,1, 1,0, o 5,0 ug), dos veces por semana durante tres semanas. Cuatro días después de la última inyección, se recogieron las articulaciones de rodilla, se introdujeron en formalina con tampón, se sometieron a des-calcificación y se intercalaron en parafina para histología. Se tiñeron las secciones frontales de las articulaciones de rodilla con azul de toluidina para evaluar la formación de tejido condral. Se capturó una imagen de la meseta tibial de cada rodilla usando un sistema de análisis de imágenes Optimas. Se analizaron microscópicamente las secciones múltiples de la rodilla derecha y se calificó de forma subjetiva la degeneración del cartílago (pérdida de condrocitos/matriz y fibrilación) y la formación de condrofitos. Se prestó especial atención a zonas (tercios exterior, medio e interior de la meseta tibial medial) y se sumó para reflejar la gravedad total de la degeneración tibial. Se evaluaron las mediciones micrométricas del alcance total de la meseta tibial afectada por la degeneración, anchura de las lesiones tibiales que superó > 50 % del espesor del cartílago (Anchura de Degeneración de Cartílago Tibial), profundidad de la lesión (Proporción de Profundidad), espesor del cartílago tibial

medio con respecto a la línea, tamaño y número de condrofitos. Se llevó a cabo el análisis estadístico de los parámetros histopatológicos por medio de comparación de grupos gracias al uso de un ensayo de T de Student bidimensional o por medio de análisis de la varianza. Todas las inyecciones y puntuaciones se llevaron a cabo por parte de investigadores que mantuvieron el anonimato con respecto a los grupos de tratamiento.

5 En este modelo de OA de rata, la degeneración del cartílago más grave aparece sobre los dos tercios superiores de la meseta tibial y alcanza niveles máximos a las 3 semanas de producirse el daño meniscal. Se administró FGF18 de 3 a 6 semanas después de la cirugía para determinar si podría inducir a la reparación del cartílago dañado. El análisis indicó que FGF18 indujo un aumento de la hipertrofia del cartílago, dependiendo de la dosis, y un sobre-
10 crecimiento de nuevo cartílago alrededor de las áreas dañadas, así como un cartílago normal en el compartimiento lateral. Específicamente, la dosis más elevada de FGF 18 (5 µg) dio como resultado una disminución de un 57 % ($p < 0,05$) de las puntuaciones de degeneración de cartílago para el tercio más externo de la meseta tibial (Tabla 1), una reducción de un 57 % ($p < 0,05$) en la anchura de la degeneración del cartílago tibial significativa (Tabla 2) y una
15 disminución de un 46 % ($p < 0,05$) en la proporción de profundidad para cualquier cambio de matriz (Tabla 3), como resultado del relleno de los defectos de cartílago con tejido de reparación. Además, FGF18 produjo aumentos del espesor de cartílago tibial medio, dependientes de la dosis, de 243 ± 21 a 319 ± 77 µm (Tabla 4) en ratas tratadas con un vehículo o 5,0 µg de FGF18, respectivamente.

20 La morfología del tejido reparado varió desde fibroso con deposición de proteoglucano hasta fibrocartílago. Parece que el tejido reparado se origina a partir de las áreas de zona marginal y áreas ampliadas a través de las zonas degradadas y, en ocasiones, superficies intactas. En casi todas las áreas, parece que el tejido de reparación se integra bien con los márgenes del cartílago normal restante. Aunque la morfología del tejido de reparación fue diferente del cartílago de hialina, pareció llenar el defecto y que finalmente no hubo cambios degenerativos. Al contrario que los animales tratados con FGF-18, las ratas tratadas solo con el vehículo no mostraron signos de
25 reparación de cartílago, excepto en los casos raros en los cuales la erosión del hueso sub-condral permitió el influjo de los hemocitoblastos de médula ósea. Además de la condrogénesis con mediación de FGF-18, se apreciaron otros cambios en las articulaciones tratadas con FGF-18. Por ejemplo, la medición del condrofito de tibia medial en las dosis de 1 ó 5 µg de FGF18 aumentó un 50 % (Tabla 5).

30 Estos datos demuestran que la administración local de FGF18 en un vehículo de hialuronano puede aumentar la formación de cartílago y puede reducir las puntuaciones de degeneración de cartílago en un modelo de ratas de osteoartritis.

Tabla 1. FGF18 redujo las puntuaciones de degeneración de cartílago tibial medio

Grupo de Tratamiento	Puntuación de Degeneración ¹	Número de ratas
HA solo	3,23 ± 0,34	10
HA + 0,1 ug de FGF18	2,57 ± 0,39	10
HA + 1,0 ug de FGF18	1,93 ± 0,24	10
HA + 5,0 ug de FGF18	1,4* ± 0,18	10

¹Media ± desviación estándar. Diferencias significativas, * $p = 0,0008$ por ANOVA

35

Tabla 2. FGF18 redujo el tamaño de las lesiones de cartílago grandes en meseta tibial medial

Grupo de Tratamiento	Anchura de Degeneración del Cartílago Tibial Significativa (um) ¹	Número de ratas
HA solo	576 ± 100,4	10
HA + 0,1 ug de FGF18	476,6 ± 95,6	10
HA + 1,0 ug de FGF18	416,8 ± 87,9	10
HA + 5,0 ug de FGF18	246,6* ± 50	10

¹Media ± desviación estándar. Diferencias significativas, * $p = 0,015$ por medio de ensayo de t de Student; $p = 0,067$ por ANOVA

Tabla 3. FGF18 redujo la profundidad de las lesiones de cartílago en meseta tibial medial

Grupo de Tratamiento	Proporción de profundidad para cualquier cambio de matriz ¹	Número de ratas
HA solo	0,45 ± 0,05	10
HA + 0,1 ug de FGF18	0,36 ± 0,04	10
HA + 1,0 ug de FGF18	0,34 ± 0,04	10
HA + 5,0 ug de FGF18	0,24* ± 0,26	10

¹Media ± desviación estándar. Diferencias significativas, * $p = 0,012$ por ANOVA

40

Tabla 4. FGF18 aumentó el espesor de cartílago tibial medial en ratas con osteoartritis inducida por desgarro meniscal

Grupo de Tratamiento	Espesor de cartílago (um) ¹	Número de ratas
HA solo	243,8 ± 6,7	10
HA + 0,1 ug de FGF18	249,2 ± 5,3	10
HA + 1,0 ug de FGF18	276,9 ± 13,5	10
HA + 5,0 ug de FGF18	319,1* ± 24,4	10

¹Media ± desviación estándar. Diferencias significativas, p < 0,05 por ANOVA

5

Tabla 5. FGF18 aumentó el tamaño de los condrofitos de la tibia medial

Grupo de Tratamiento	Tamaño de los condrofitos (um) ¹	Número de ratas
HA solo	602,4 ± 49,1	10
HA + 0,1 ug de FGF18	579,0 ± 34,8	10
HA + 1,0 ug de FGF18	874,9 ± 120,9	10
HA + 5,0 ug de FGF18	913,3 ± 51,9	10

¹Media ± desviación estándar. Diferencias significativas, p = 0,0005 por ANOVA

LISTADO DE SECUENCIAS

10

<110> ZymoGenetics, Inc.

<120> PROCEDIMIENTOS DE ADMINISTRACIÓN DE FGF18

15

<130> 02-21PC

<150>60/416.670

<151> 2002-10-07

20

<160> 4

<170> FastSEQ para Windows versión 4,0

<210> 1

25

<211> 917

<212> ADN

<213> Homo sapiens

<220>

30

<221> CDS

<222> (1)...(621)

<400> 1

ES 2 493 840 T3

atg	tat	tca	gcg	ccc	tcc	gcc	tgc	act	tgc	ctg	tgt	tta	cac	ttc	ctg	48
Met	Tyr	Ser	Ala	Pro	Ser	Ala	Cys	Thr	Cys	Leu	Cys	Leu	His	Phe	Leu	
1				5					10					15		
ctg	ctg	tgc	ttc	cag	gta	cag	gtg	ctg	gtt	gcc	gag	gag	aac	gtg	gac	96
Leu	Leu	Cys	Phe	Gln	Val	Gln	Val	Leu	Val	Ala	Glu	Glu	Asn	Val	Asp	
			20					25					30			
ttc	cgc	atc	cac	gtg	gag	aac	cag	acg	cgg	gct	cgg	gac	gat	gtg	agc	144
Phe	Arg	Ile	His	Val	Glu	Asn	Gln	Thr	Arg	Ala	Arg	Asp	Asp	Val	Ser	
		35					40					45				
cgt	aag	cag	ctg	cgg	ctg	tac	cag	ctc	tac	agc	cgg	acc	agt	ggg	aaa	192
Arg	Lys	Gln	Leu	Arg	Leu	Tyr	Gln	Leu	Tyr	Ser	Arg	Thr	Ser	Gly	Lys	
	50					55					60					
cac	atc	cag	gtc	ctg	ggc	cgc	agg	atc	agt	gcc	cgc	ggc	gag	gat	ggg	240
His	Ile	Gln	Val	Leu	Gly	Arg	Arg	Ile	Ser	Ala	Arg	Gly	Glu	Asp	Gly	
65					70					75					80	
gac	aag	tat	gcc	cag	ctc	cta	gtg	gag	aca	gac	acc	ttc	ggt	agt	caa	288
Asp	Lys	Tyr	Ala	Gln	Leu	Leu	Val	Glu	Thr	Asp	Thr	Phe	Gly	Ser	Gln	
				85					90					95		
gtc	cgg	atc	aag	ggc	aag	gag	acg	gaa	ttc	tac	ctg	tgc	atg	aac	cgc	336
Val	Arg	Ile	Lys	Gly	Lys	Glu	Thr	Glu	Phe	Tyr	Leu	Cys	Met	Asn	Arg	
			100					105					110			
aaa	ggc	aag	ctc	gtg	ggg	aag	ccc	gat	ggc	acc	agc	aag	gag	tgt	gtg	384
Lys	Gly	Lys	Leu	Val	Gly	Lys	Pro	Asp	Gly	Thr	Ser	Lys	Glu	Cys	Val	
		115					120					125				
ttc	atc	gag	aag	gtt	ctg	gag	aac	aac	tac	acg	gcc	ctg	atg	tcg	gct	432
Phe	Ile	Glu	Lys	Val	Leu	Glu	Asn	Asn	Tyr	Thr	Ala	Leu	Met	Ser	Ala	
	130					135					140					
aag	tac	tcc	ggc	tgg	tac	gtg	ggc	ttc	acc	aag	aag	ggg	cgg	ccg	cgg	480
Lys	Tyr	Ser	Gly	Trp	Tyr	Val	Gly	Phe	Thr	Lys	Lys	Gly	Arg	Pro	Arg	
145					150					155					160	
aag	ggc	ccc	aag	acc	cgg	gag	aac	cag	cag	gac	gtg	cat	ttc	atg	aag	528
Lys	Gly	Pro	Lys	Thr	Arg	Glu	Asn	Gln	Gln	Asp	Val	His	Phe	Met	Lys	
				165					170					175		
cgc	tac	ccc	aag	ggg	cag	ccg	gag	ctt	cag	aag	ccc	ttc	aag	tac	acg	576
Arg	Tyr	Pro	Lys	Gly	Gln	Pro	Glu	Leu	Gln	Lys	Pro	Phe	Lys	Tyr	Thr	
			180					185					190			
acg	gtg	acc	aag	agg	tcc	cgt	cgg	atc	cgg	ccc	aca	cac	cct	gcc		621
Thr	Val	Thr	Lys	Arg	Ser	Arg	Arg	Ile	Arg	Pro	Thr	His	Pro	Ala		
		195					200						205			
taggccaccc	cgccgcggcc	ctcaggtcgc	cctggccaca	ctcacactcc	cagaaaactg											681
catcagagga	atatttttac	atgaaaaata	aggattttat	tgttgacttg	aaacccccga											741
tgacaaaaga	ctcacgcaa	gggactgtag	tcaaccaca	ggtgcttgtc	tctctctagg											801
aacagacaac	tctaaactcg	tccccagagg	aggacttgaa	tgaggaaacc	aacactttga											861
gaaaccaaaag	tcctttttcc	caaaggttct	gaaaaaaaaa	aaaaaaaaaa	ctcgag											917

ES 2 493 840 T3

<210> 2
 <211> 207
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

5
 <400> 2

```

Met Tyr Ser Ala Pro Ser Ala Cys Thr Cys Leu Cys Leu His Phe Leu
 1      5      10      15
Leu Leu Cys Phe Gln Val Gln Val Leu Val Ala Glu Glu Asn Val Asp
 20      25      30
Phe Arg Ile His Val Glu Asn Gln Thr Arg Ala Arg Asp Asp Val Ser
 35      40      45
Arg Lys Gln Leu Arg Leu Tyr Gln Leu Tyr Ser Arg Thr Ser Gly Lys
 50      55      60
His Ile Gln Val Leu Gly Arg Arg Ile Ser Ala Arg Gly Glu Asp Gly
 65      70      75
Asp Lys Tyr Ala Gln Leu Leu Val Glu Thr Asp Thr Phe Gly Ser Gln
 85      90      95
Val Arg Ile Lys Gly Lys Glu Thr Glu Phe Tyr Leu Cys Met Asn Arg
100     105     110
Lys Gly Lys Leu Val Gly Lys Pro Asp Gly Thr Ser Lys Glu Cys Val
115     120     125
Phe Ile Glu Lys Val Leu Glu Asn Asn Tyr Thr Ala Leu Met Ser Ala
130     135     140
Lys Tyr Ser Gly Trp Tyr Val Gly Phe Thr Lys Lys Gly Arg Pro Arg
145     150     155
Lys Gly Pro Lys Thr Arg Glu Asn Gln Gln Asp Val His Phe Met Lys
165     170     175
Arg Tyr Pro Lys Gly Gln Pro Glu Leu Gln Lys Pro Phe Lys Tyr Thr
180     185     190
Thr Val Thr Lys Arg Ser Arg Arg Ile Arg Pro Thr His Pro Ala
195     200     205
    
```

10 <210> 3
 <211> 1023
 <212> ADN
 <213> Mus musculus

15 <220>
 <221> CDS
 <222> (1)...(624)

20 <400> 3

25

30

35

40

ES 2 493 840 T3

```

atg tat tca gcg ccc tcc gcc tgc act tgc ctg tgt tta cac ttt cta 48
Met Tyr Ser Ala Pro Ser Ala Cys Thr Cys Leu Cys Leu His Phe Leu
1 5 10 15

ctg ctg tgc ttc cag gtt cag gtg ttg gca gcc gag gag aat gtg gac 96
Leu Leu Cys Phe Gln Val Gln Val Leu Ala Ala Glu Glu Asn Val Asp
20 25 30

ttc cgc atc cac gtg gag aac cag acg cgg gct cga gat gat gtg agt 144
Phe Arg Ile His Val Glu Asn Gln Thr Arg Ala Arg Asp Asp Val Ser
35 40 45

cgg aag cag ctg cgc ttg tac cag ctc tat agc agg acc agt ggg aag 192
Arg Lys Gln Leu Arg Leu Tyr Gln Leu Tyr Ser Arg Thr Ser Gly Lys
50 55 60

cac att caa gtc ctg ggc cgt agg atc agt gcc cgt ggc gag gac ggg 240
His Ile Gln Val Leu Gly Arg Arg Ile Ser Ala Arg Gly Glu Asp Gly
65 70 75 80

gac aag tat gcc cag ctc cta gtg gag aca gat acc ttc ggg agt caa 288
Asp Lys Tyr Ala Gln Leu Leu Val Glu Thr Asp Thr Phe Gly Ser Gln
85 90 95

gtc cgg atc aag ggc aag gag aca gaa ttc tac ctg tgt atg aac cga 336
Val Arg Ile Lys Gly Lys Glu Thr Glu Phe Tyr Leu Cys Met Asn Arg
100 105 110

aaa ggc aag ctc gtg ggg aag cct gat ggt act agc aag gag tgc gtg 384
Lys Gly Lys Leu Val Gly Lys Pro Asp Gly Thr Ser Lys Glu Cys Val
115 120 125

ttc att gag aag gtt ctg gaa aac aac tac acg gcc ctg atg tct gcc 432
Phe Ile Glu Lys Val Leu Glu Asn Asn Tyr Thr Ala Leu Met Ser Ala
130 135 140

aag tac tct ggt tgg tat gtg ggc ttc acc aag aag ggg cgg cct cgc 480
Lys Tyr Ser Gly Trp Tyr Val Gly Phe Thr Lys Lys Gly Arg Pro Arg
145 150 155 160

aag ggt ccc aag acc cgc gag aac cag caa gat gta cac ttc atg aag 528
Lys Gly Pro Lys Thr Arg Glu Asn Gln Gln Asp Val His Phe Met Lys
165 170 175

cgt tac ccc aag gga cag gcc gag ctg cag aag ccc ttc aaa tac acc 576
Arg Tyr Pro Lys Gly Gln Ala Glu Leu Gln Lys Pro Phe Lys Tyr Thr
180 185 190

aca gtc acc aag cga tcc cgg cgg atc cgc ccc act cac ccc ggc tag 624
Thr Val Thr Lys Arg Ser Arg Arg Ile Arg Pro Thr His Pro Gly *
195 200 205

gtccggccac actcaccccc ccagagaact acatcagagg aatattttta catgaaaaat 684
aaggaagaat ctctattttt gtacattgtg tttaaaagaa gacaaaaact gaacctaaag 744
tcttgggagg aggggcgata ggattccact gttgacctga accccatgac aaaggactca 804
cacaagggga ccgctgtcaa cccacaggtg cttgcctctc tctaggaggt gacaattcaa 864
aactcatccc cagaggagga cttgaacgag gaaactgcga gaaaccaaaag tcctttcccc 924
ccaaaggttc tgaaagcaaa caaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa 984

aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa gggcggccgc tctagagga 1023

```

- <210>4
- 5 <211> 207
- <212> PRT
- <213> Mus musculus
- <400> 4
- 10

Met	Tyr	Ser	Ala	Pro	Ser	Ala	Cys	Thr	Cys	Leu	Cys	Leu	His	Phe	Leu
1				5					10					15	
Leu	Leu	Cys	Phe	Gln	Val	Gln	Val	Leu	Ala	Ala	Glu	Glu	Asn	Val	Asp
			20					25					30		
Phe	Arg	Ile	His	Val	Glu	Asn	Gln	Thr	Arg	Ala	Arg	Asp	Asp	Val	Ser
		35				40						45			
Arg	Lys	Gln	Leu	Arg	Leu	Tyr	Gln	Leu	Tyr	Ser	Arg	Thr	Ser	Gly	Lys
	50					55					60				
His	Ile	Gln	Val	Leu	Gly	Arg	Arg	Ile	Ser	Ala	Arg	Gly	Glu	Asp	Gly
65					70					75					80
Asp	Lys	Tyr	Ala	Gln	Leu	Leu	Val	Glu	Thr	Asp	Thr	Phe	Gly	Ser	Gln
				85					90					95	
Val	Arg	Ile	Lys	Gly	Lys	Glu	Thr	Glu	Phe	Tyr	Leu	Cys	Met	Asn	Arg
			100					105					110		
Lys	Gly	Lys	Leu	Val	Gly	Lys	Pro	Asp	Gly	Thr	Ser	Lys	Glu	Cys	Val
			115				120					125			
Phe	Ile	Glu	Lys	Val	Leu	Glu	Asn	Asn	Tyr	Thr	Ala	Leu	Met	Ser	Ala
	130					135					140				
Lys	Tyr	Ser	Gly	Trp	Tyr	Val	Gly	Phe	Thr	Lys	Lys	Gly	Arg	Pro	Arg
145					150					155					160
Lys	Gly	Pro	Lys	Thr	Arg	Glu	Asn	Gln	Gln	Asp	Val	His	Phe	Met	Lys
				165						170				175	
Arg	Tyr	Pro	Lys	Gly	Gln	Ala	Glu	Leu	Gln	Lys	Pro	Phe	Lys	Tyr	Thr
			180					185					190		
Thr	Val	Thr	Lys	Arg	Ser	Arg	Arg	Ile	Arg	Pro	Thr	His	Pro	Gly	
		195					200						205		

REIVINDICACIONES

- 5 1.- Una composición para administración intra-articular de polipéptidos condrogénicos que comprende una mezcla farmacéuticamente aceptable que comprende FGF18 y un vehículo negativamente cargado, en la que el vehículo negativamente cargado está seleccionado entre el grupo que consiste en:
- 10 hialuronanos, en los que los hialuronanos son formas de hialuronanos de bajo peso molecular o formas de hialuronanos de alto peso molecular;
proteoglucanos sulfatados;
10 tetradecasulfato de B-ciclodextrina; y
microesferas de alginato.
- 15 2. Una composición de acuerdo con la reivindicación 1, en la que el vehículo negativamente cargado es un hialuronano de bajo peso molecular o un hialuronano de alto peso molecular.
3. Una composición de acuerdo con la reivindicación 1 ó 2, en la que dicha composición es una formulación de liberación retardada.
- 20 4. Una composición de acuerdo con la reivindicación 3, en la que dicha formulación de liberación retardada comprende una matriz seleccionada entre el grupo que consiste en una disolución, un gel, una pasta o una masilla.
5. Una composición de acuerdo con la reivindicación 3, en la que dicha formulación de liberación retardada comprende un sistema de reserva.
- 25 6. Una composición de acuerdo con la reivindicación 1 ó 2, que además comprende un fármaco anti-inflamatorio.
7. Una composición como se define en la reivindicación 1 ó 2, para su uso en un procedimiento de reparación de tejido cartilaginoso por medio del aumento de la proliferación de condrocitos en una articulación de un mamífero que lo necesita.
- 30 8. Una composición como se define en la reivindicación 1 ó 2, para su uso en un procedimiento de tratamiento de la osteoartritis en un mamífero.
- 35 9. Una composición como se define en la reivindicación 1 ó 2, para su uso en un procedimiento de acuerdo con la reivindicación 7 ó 8, en el que dicha composición es para administración al interior de la cavidad sinovial.
- 40 10. Una composición como se define en la reivindicación 1 ó 2, para su uso en un procedimiento de acuerdo con la reivindicación 7 ó 8, en el que dicha composición es una formulación de liberación retardada.
- 45 11. Una composición como se define en la reivindicación 1 ó 2, para su uso en un procedimiento de acuerdo con la reivindicación 10, en el que dicha formulación de liberación retardada comprende una matriz seleccionada entre el grupo que consiste en una disolución, un gel, una pasta o una masilla.
12. Una composición como se define en la reivindicación 1 ó 2, para su uso en un procedimiento de acuerdo con la reivindicación 10, en el que dicha formulación de liberación retardada comprende un sistema de reserva.
13. Una composición como se define en la reivindicación 1 ó 2, para su uso en un procedimiento de acuerdo con la reivindicación 9, en el que dicha composición es para administración por inyección.
- 50 14. Una composición como se define en la reivindicación 1 ó 2, para su uso en un procedimiento de acuerdo con la reivindicación 9, en el que dicha composición es para administración por implante quirúrgico.
- 55 15. Una composición como se define en la reivindicación 1 ó 2, para su uso en un procedimiento de acuerdo con la reivindicación 9, en el que dicha composición permite el crecimiento de un nuevo tejido de cartílago y la formación quirúrgica del contorno de la nueva superficie de cartílago.
- 60 16. El uso de una composición de acuerdo con la reivindicación 1 ó 2, para la fabricación de un medicamento para la reparación de tejido cartilaginoso por medio del aumento de la proliferación de condrocitos en una articulación de un mamífero.
- 65 17. El uso de una composición de acuerdo con la reivindicación 1 ó 2, para la fabricación de un medicamento para el tratamiento de la osteoartritis en un mamífero.
18. El uso de acuerdo con la reivindicación 16 ó 17, en el que dicho medicamento o dicha composición es como se define en cualquiera de las reivindicaciones 3-6.

19. Una composición como se define en la reivindicación 1 ó 2, para su uso en un procedimiento para mantener el tejido cartilaginoso en una articulación dañada por osteoartritis, artritis reumatoide o lesión traumática.

5 20. El uso de una composición de acuerdo con la reivindicación 1 ó 2, para la fabricación de un medicamento para mantener tejido cartilaginoso en una articulación dañada por osteoartritis, artritis reumatoide o lesión traumática.