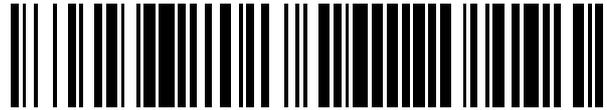


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 575 477**

51 Int. Cl.:

A61K 38/29 (2006.01)

A61P 19/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **15.12.2009 E 09836848 (3)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **09.03.2016 EP 2373682**

54 Título: **Tratamiento de osteoartritis en estadio temprano**

30 Prioridad:

16.12.2008 US 336209

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

28.06.2016

73 Titular/es:

**KAOHSIUNG MEDICAL UNIVERSITY (100.0%)
100 Shih-Chuan 1st Road, San Ming District
Kaohsiung, 807, CN**

72 Inventor/es:

**HO, MEI-LING;
WANG, GWO-JAW;
CHANG, JE-KEN;
FU, YIN-CHIH y
CHEN, CHUNG-HWAN**

74 Agente/Representante:

ARIAS SANZ, Juan

Observaciones :

Véase nota informativa (Remarks) en el folleto original publicado por la Oficina Europea de Patentes

ES 2 575 477 T3

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

DESCRIPCIÓN

Tratamiento de osteoartritis en estadio temprano

Lista de secuencias

5 La presente solicitud contiene una lista de secuencias que se ha presentado a través de EFS-Web y se incorpora al presente documento como referencia en su totalidad. Dicha copia de ASCII, se creó el 15 de diciembre de 2009, se denominó 383295US.txt y tiene un tamaño de 4.289 bytes.

Campo

10 La presente divulgación se refiere a los aminoácidos 1-34 de la hormona paratiroidea para su uso en un tratamiento de osteoartritis, y en particular se refiere a los aminoácidos 1-34 de la hormona paratiroidea para su uso en el tratamiento de osteoartritis en estadio temprano mediante la inyección intraarticular de los aminoácidos 1-34 de la hormona paratiroidea.

Antecedentes

15 La artritis abarca un grupo de estados que implican daño en las articulaciones del cuerpo. La artritis es la principal causa de incapacidad en personas mayores de cincuenta y cinco años. La forma más común de artritis, la osteoartritis (OA) es un resultado de un traumatismo en la articulación, infección de la articulación o la edad. La osteoartritis es un síndrome clínico en el que la inflamación de grado bajo da como resultado dolor en las articulaciones, producido por un desgaste anómalo del cartílago que cubre y actúa como un cojín dentro de las articulaciones y la destrucción o el cambio de las características de líquido sinovial que lubrica esas articulaciones. A medida que la superficie del hueso queda menos protegida por el cartílago, el paciente experimenta dolor al soportar peso, incluyendo al caminar y al estar de pie. Debido al movimiento aumentado a causa del dolor, los músculos de la región pueden atrofiarse y los ligamentos pueden volverse más laxos.

20 La osteoartritis afecta a casi 21 millones de personas en los Estados Unidos, representando el 25% de las visitas a los médicos de atención primaria, y la mitad de las prescripciones de fármacos antiinflamatorios no esteroideos (AINE). Se estima que el 80% de la población tendrá pruebas radiográficas de osteoartritis a la edad de 65 años, aunque solo el 60% de ellos serán sintomáticos.

25 La osteoartritis es una enfermedad articular cada vez más común a medida que el número de personas ancianas crece en muchos países. En los EE.UU., por ejemplo, el 10% de la población mayor de 60 años tiene OA. Los tratamientos actuales para OA implican principalmente el uso de fármacos antiinflamatorios, analgésicos y complementos lubricantes. Por tanto, es una prioridad desarrollar agentes que supriman la progresión de OA en un estadio temprano.

30 En pacientes con OA, se sabe que los condrocitos pueden adoptar cambios fenotípicos tales como los que se producen en placas de crecimiento epifisario, en donde los condrocitos experimentan el proceso de diferenciación terminal desde hipertrofia a deposición mineral hasta finalmente apoptosis (Blanco FJ *et al.*, *Arthritis Rheum* 1998; 41: 284-9; Kirsch T *et al.*, *Osteoarthritis Cartilage* 2000; 8: 294-302). Los condrocitos en OA expresan las proteínas marcadoras de condrocitos hipertróficos, incluyendo anexina, fosfatasa alcalina y colágeno de tipo X (Col X), pero no colágeno de tipo II (Col II).

35 Un bucle de retroalimentación que regula la osificación endocondral en placas de crecimiento implica el péptido relacionado con hormona paratiroidea (PTHrP), Indian hedgehog (IHH) y Bcl-2. PTHrP mantiene la función de condrocitos en proliferación e inhibe la diferenciación de condrocitos hacia hipertrofia (Horton WE Jr *et al.*, *Matrix Biol* 1998; 17: 107-15; Weisser J *et al.*, *Exp Cell Res*, 2002; 279: 1-13). Informes previos han indicado que los cambios biológicos en condrocitos articulares durante la progresión de OA son similares a los de la osificación endocondral (Blanco FJ, *et al.*, *Arthritis Rheum* 1998; 41: 284-9; Kirsch T *et al.*, *Osteoarthritis Cartilage* 2000; 8: 294-302).

40 Los cambios biológicos de la diferenciación de condrocitos en la placa de crecimiento son similares a los observados en la progresión de la osteoartritis. Se ha notificado que, en osteoartritis, los cambios fenotípicos para condrocitos son similares a los producidos en placas de crecimiento epifisario, en las que los condrocitos experimentan diferenciación terminal, hipertrofia, deposición de mineral y finalmente apoptosis (*Arthritis. Rheum.* (1998) 41(2): 284-9; *Ann. Rheum. Dis.* (2000) 59(12): 959-65; *Osteoarthritis Cartilage* (2000) 8(4): 294-302). Los condrocitos en osteoartritis expresan las proteínas marcadoras de condrocitos hipertróficos, incluyendo anexinas, fosfatasa alcalina y colágeno de tipo X (Col X), pero eliminan la expresión de colágeno de tipo II (Col II).

50 Se ha sugerido que la proteína relacionada con hormona paratiroidea (PTHrP) podría ser útil para el tratamiento de osteoartritis. La solicitud de patente PCT, WO2008/156725, por ejemplo, describe la inhibición de la mineralización del cartílago articular mediante la inyección de PTHrP en la zona profunda del cartílago articular. Tal como se indicó

anteriormente, la diferenciación de condrocitos implica procesos complejos, incluyendo proliferación celular, hipertrofia, diferenciación terminal, mineralización y muerte celular (apoptosis). Sin embargo, la técnica no parece proporcionar ningún método que revierta el proceso degenerativo de los condrocitos, que implica mineralización del cartílago articular que se produce durante el desarrollo de osteoartritis en un paciente.

- 5 Por consiguiente, existe la necesidad de métodos que inhiban o prevengan la mineralización del cartílago y la apoptosis de condrocitos, que inhiban o reviertan el proceso degenerativo de condrocitos en el estadio temprano de osteoartritis, y que puedan usarse para el tratamiento de osteoartritis, particularmente osteoartritis en estadio temprano.

Sumario

- 10 En un aspecto, la presente divulgación proporciona los aminoácidos 1-34 de la hormona paratiroidea para su uso en el tratamiento de osteoartritis en estadio temprano en un ser humano mediante inyección intraarticular de los aminoácidos 1-34 de la hormona paratiroidea en el intervalo de dosis terapéuticamente eficaz de 0,1 pmol a 5000 pmol.

- 15 En una realización de la presente invención, los aminoácidos 1-34 de la hormona paratiroidea se proporcionan mediante la administración de una dosis terapéuticamente activa de desde 5 pmol hasta 300 pmol.

Breve descripción de los dibujos

La invención de la presente divulgación se entenderá mejor a partir de la siguiente descripción con referencia a los dibujos adjuntos, en los que:

- 20 Las figuras 1A-1F muestran los cambios en los niveles de (A) ARNm para agregano, (B) glucosaminoglicano (GAG), (C) colágeno de tipo II α 1 (Col2a1), (D) colágeno de tipo X α 1 (Col10a1), (E) fosfatasa alcalina (ALP), y (F) Indian hedgehog (IHH) en condrocitos articulares humanos control o tratados con azaC, con o sin tratamiento con PTH (1-34), un péptido de 34 aminoácidos de longitud constituido por los aminoácidos amino-terminales 1 a 34 de la hormona paratiroidea humana.

- 25 Las figuras 2A-2C muestran los cambios en (A) la expresión de ARNm para Bcl-2, (B) la expresión de ARNm para Bax y (C) la razón de Bcl-2 frente a Bax en condrocitos articulares humanos control o tratados con azaC, con o sin tratamiento con PTH (1-34).

La figura 3 muestra el efecto de la PTH (1-34) sobre la apoptosis inducida por azaC en condrocitos articulares humanos.

- 30 La figura 4 muestra el efecto de la PTH (1-34) sobre los niveles de glucosaminoglicano (GAG) en cartílago articular de rata normal y osteoarthrítico (OA).

La figura 5 muestra el efecto de la PTH (1-34) sobre colágeno de tipo II inmunolocalizado en cartílago articular de rata normal y osteoarthrítico (OA).

La figura 6 muestra el efecto de la PTH (1-34) sobre la apoptosis de condrocitos en cartílago articular de rata normal y osteoarthrítico (OA).

- 35 La figura 7 muestra el efecto de la PTH (1-34) en 3 dosificaciones sobre los niveles de glucosaminoglicano (GAG) en cartílago articular de rata osteoarthrítico (OA).

Descripción detallada

- 40 Las siguientes descripciones de las realizaciones preferidas y los dibujos se enumeran solamente con fines de ilustración y no como una definición de los límites de la presente invención, para lo que debe hacerse referencia a las reivindicaciones adjuntas.

La terminología usada en el presente documento tiene el único fin de describir realizaciones particulares de la invención y no pretende ser limitativa. A menos que se defina lo contrario, todos los términos técnicos y científicos usados en el presente documento tienen el mismo significado que entiende comúnmente un experto habitual en la técnica a la que se refiere esta invención.

- 45 Finalmente, tal como se usa en esta memoria y en las reivindicaciones adjuntas, las formas singulares “un”, “una” y “el/la” incluyen referentes en plural a menos que el contenido indique claramente lo contrario.

Definiciones

Los términos “hormona paratiroidea (PTH)” y “PTH” de la presente divulgación se refieren a hormona paratiroidea,

particularmente hormona paratiroidea humana y sus derivados. La hormona paratiroidea usada en los métodos de la presente divulgación puede producirse en diversas formas tales como PTH de tipo nativo, PTH producida con técnicas de ingeniería genética o PTH sintetizada químicamente. Ejemplos de derivados de PTH son péptidos parciales de la PTH tal como se definió anteriormente, los aminoácidos constituyentes de la PTH de péptidos parciales de la misma que pueden sustituirse parcialmente por otros aminoácidos, los aminoácidos constituyentes de la PTH o péptidos parciales de la misma que pueden estar parcialmente empobrecidos, así como péptidos que pueden tener uno o más aminoácidos añadidos a la PTH o péptidos parciales de la misma. Obsérvese que los péptidos como derivados de PTH pueden tener actividades similares a la propia PTH. Los ejemplos de péptidos parciales de PTH incluyen PTH humana (1-34), PTH humana (1-64), PTH humana (35-84) y PTH bovina (1-34). PTH (1-34) se refiere a un péptido parcial de PTH que está compuesto por 34 aminoácidos tal como se cuenta desde el extremo N-terminal de PTH. El agente administrado de la presente invención es PTH (1-34) (es decir PTH humana (1-34)). Los términos "aminoácidos 1-34 de la hormona paratiroidea" incluyen pero no se limitan a, PTH humana recombinante (1-34), PTH humana sintética (1-34), PTH (1-34), sales de PTH humana (1-34), derivados sencillos de PTH humana (1-34), tal como amida de PTH humana (1-34). Los ejemplos de sales de PTH humana adecuadas incluyen pero no se limitan a acetato, adipato, angelato, bromuro, butirato, cloruro, citrato, citraconato, citramalato, crotonato, propionato, pentanoato, hexanoato, heptanoato, levulinato, succinato, maleato, glicolato, gluconato, glucuronato, 3-hidroxiisobutirato, tricarbálicato, malonato, glutarato, itaconato, mesaconato, dimetilolpropionato, tiglicato, glicerato, metacrilato, isocrotonato, beta-hidroxibutirato, hidracrilato, ascorbato, aspartato, glutamato, 2-hidroxiisobutirato, lactato, malato, piruvato, fumarato, tartarato, nitrato, fosfato, benceno, sulfonato, metanosulfonato, sulfato y sulfonato. El término indicado "aminoácidos 1-34 de la hormona paratiroidea" también puede abarcar diversas formas, tales como ácidos, bases libres, moléculas cargadas o no cargadas, componentes de complejos moleculares o sales farmacéuticamente aceptables no irritantes.

La expresión "osteoartritis en estadio temprano" usada en el presente documento abarca, pero no se limita a estados médicos en los que el cartílago articular del animal aquejado, por ejemplo de ser humano aquejado, muestra pocos o ningún signo de fibrilación y el grosor global del cartílago se conserva aparentemente, aunque algunas agrupaciones de condrocitos pueden ser evidentes. El término "osteoartritis en estadio temprano" se caracteriza por la observación de que no más del 70% de los condrocitos de la muestra de cartílago del animal aquejado muestra inmunotinción para fosfatasa alcalina, anexinas y colágeno de tipo X. (T. Kirsch *et al.*, Osteoarthritis and Cartilage (2000) 8: 294-302). Los animales aquejados, por ejemplo, seres humanos, que padecen osteoartritis en estadio temprano, pueden sentir menos rigidez y dolor articular ocasional, y algunos de ellos pueden sentir dolor articular localizado.

El término "cavidad de la articulación", tal como se usa en el presente documento se refiere al espacio lleno de fluido entre los huesos de una articulación sinovial.

El término "inyección intraarticular" se refiere a un método de administración de un medicamento a la cavidad de una articulación de un paciente que implica el uso de una jeringa u otro dispositivo de inyección.

El "sujeto", "paciente" o "animal" aquejado tratado según los métodos dados a conocer puede ser un ser humano o un mamífero no humano, y por tanto el "sujeto", "paciente" o "animal" aquejado puede ser un ser humano, así como un perro, gato, ratón, rata, vaca, oveja, cerdo, cabra o un primate, y puede incluir animales de laboratorio, ganado y animales domésticos. En determinadas realizaciones, el sujeto, paciente o animal aquejado es un ser humano aquejado de osteoartritis, y más particularmente un ser humano aquejado de osteoartritis en estadio temprano.

El término "proceso degenerativo", con respecto a la degeneración de condrocitos, se caracteriza, por ejemplo, por un cambio de la síntesis de componentes de la matriz de los condrocitos, tal como una disminución en colágeno de tipo II y un aumento en colágeno de tipo X, y abarca, pero no se limita a diferenciación terminal de condrocitos.

OSTEOARTRITIS EN ESTADIO TEMPRANO Y TRATAMIENTO DE LA MISMA

Los síntomas de la osteoartritis en estadio temprano pueden incluir dolor, rigidez, movimiento articular limitado, hinchazón y alargamiento óseo. Estos síntomas pueden manifestarse por sí mismos en diversas partes de un animal aquejado, tal como en una cadera, una rodilla, en las manos, o cualquier otra articulación en el cuerpo. Además, estos síntomas pueden manifestarse durante determinadas actividades tales como flexionarse, ponerse de rodillas, subir escaleras, correr, remar y otro ejercicio físico intenso o prolongado, dolor y rigidez en una articulación durante o tras el uso, o tras un periodo de inactividad, o cualquier combinación de las mismas. Además, el síntoma puede estar relacionado con o agravarse por la meteorología, tal como molestias en una articulación antes de o durante un cambio en la meteorología, por ejemplo, asociado con un cambio en la presión barométrica.

El tratamiento de un animal, por ejemplo un ser humano aquejado de osteoartritis en estadio temprano, con los aminoácidos 1-34 de PTH según la presente invención puede mantener la condrogénesis y supervivencia continuada de condrocitos articulares suprimiendo de ese modo la progresión de la osteoartritis.

Los cambios de condrocitos que se producen en la osteoartritis se imitan mediante un modelo de cultivo celular establecido que implica diferenciación terminal inducida por azaC de condrocitos articulares humanos, que se usó para establecer el uso de PTH para el tratamiento de osteoartritis en estadio temprano. Usando este modelo de

cultivos de condrocitos articulares humanos, se encontró que el tratamiento con PTH (1-34) no sólo rescata la supresión de colágeno de tipo II inducida por azaC sino que también aumenta la expresión de colágeno de tipo II. También se encontró un efecto similar de PTH (1-34) sobre los cambios en los niveles de glucosaminoglicano (GAG). Los condrocitos articulares normales expresan colágeno de tipo II y agrecano, requeridos para la función apropiada del cartílago articular. Cuando experimentan diferenciación terminal, que conduce a osteoartritis, los condrocitos expresarán marcadores, incluyendo fosfatasa alcalina y colágeno de tipo X, mientras que la expresión de colágeno de tipo II y agrecano disminuirá. Este proceso degenerativo puede conducir a mineralización de condrocitos y finalmente a muerte celular. Por tanto, los métodos de la presente divulgación pueden inhibir, detener o revertir el proceso degenerativo de los condrocitos en el estadio temprano de OA.

Según la presente invención, los aminoácidos 1-34 de la hormona paratiroidea para su uso para el tratamiento de la articulación osteoartítica en estadio temprano pueden inhibir o prevenir la muerte celular (apoptosis) de los condrocitos.

Las características clínicas de la osteoartritis incluyen dolor articular, rigidez matutina que dura más de 30 minutos, inestabilidad articular o deformación, y pérdida de función. Los signos de osteoartritis incluyen alargamiento óseo en las articulaciones afectadas, limitación del intervalo de movimiento, crepitación tras el movimiento de la articulación, dolor con el movimiento y alineación errónea de la articulación afectada, y deformidad de la articulación afectada. Los métodos ilustrativos para la detección de osteoartritis en estadio temprano incluyen los basados en métodos radiológicos que pueden detectar y determinar la presencia y la concentración de glucosaminoglucanos (GAG) en el cartílago articular. Tales métodos incluyen técnicas de IRM identificadas como "IRM de cartílago potenciada con gadolinio retardada" (dGEMRIC) y "transferencia de saturación dependiente de intercambio químico" (gagCEST) (véase por ejemplo, Ling *et al.* (2009) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 105(7): 2266-70) así como métodos basados en tomografía computarizada (véase por ejemplo Josh *et al.* (2009) J. Am. Chem. Soc. 131(37): 13234-35). Los métodos adicionales para el diagnóstico de osteoartritis incluyen ultrasonografía y radiografía simple (rayos X) así como métodos invasivos, incluyendo artrografía y artroscopia (véase por ejemplo Tsai *et al.* (2007) Osteoarthritis and Cartilage 15: 245-50, y Lee *et al.* (2008) Osteoarthritis and Cartilage 16: 352-58.

Una vez diagnosticada, la osteoartritis en estadio temprano puede tratarse usando los aminoácidos 1-34 de PTH dados a conocer en el presente documento. En determinadas realizaciones, se usan los aminoácidos 1-34 de PTH para tratar osteoartritis en estadio temprano mediante la administración de PTH (1-34) (PTH humana (1-34)) en la cavidad de la articulación afectada de un paciente, por ejemplo, mediante inyección en el espacio lleno de fluido entre los huesos de una articulación sinovial.

En un aspecto de tales realizaciones, el agente se inyecta en el líquido sinovial de la articulación afectada usando una jeringa u otro dispositivo de inyección. La determinación de la cantidad y la formulación del agente y la frecuencia de administración del mismo están dentro del alcance profesional del personal médico apropiado al que se facilita la presente divulgación. El agente se administra en una cantidad dentro del intervalo de desde aproximadamente 0,1 pmol hasta aproximadamente 5000 pmol, desde aproximadamente 0,5 pmol hasta aproximadamente 1500 pmol, dentro del intervalo de desde aproximadamente 1 pmol hasta aproximadamente 1000 pmol, dentro del intervalo de desde aproximadamente 2,5 pmol hasta aproximadamente 500 pmol, o dentro del intervalo de desde aproximadamente 5 pmol hasta aproximadamente 300 pmol. En determinadas realizaciones, la dosis terapéuticamente eficaz es la que proporciona una concentración inicial del agente en líquido sinovial de la articulación sinovial dentro del intervalo de desde aproximadamente 0,1 nM hasta aproximadamente 200 nM, dentro del intervalo de desde aproximadamente 0,25 nM hasta aproximadamente 100 nM, dentro del intervalo de desde aproximadamente 0,5 nM hasta aproximadamente 75 nM, dentro del intervalo de desde aproximadamente 0,75 nM hasta aproximadamente 50 nM, o dentro del intervalo de desde aproximadamente 1 nM hasta aproximadamente 25 nM. En otro aspecto, se proporciona una dosis terapéutica del agente mediante la administración de desde aproximadamente 0,1 ml hasta aproximadamente 10 ml de una disolución en la que el agente está presente a una concentración dentro del intervalo de desde aproximadamente 1 nM hasta aproximadamente 500 nM. En otro aspecto, el agente se administra en un volumen dentro del intervalo de desde aproximadamente 1 ml hasta aproximadamente 3 ml y el agente está presente en esa disolución a una concentración dentro del intervalo de desde aproximadamente 5 nM hasta aproximadamente 100 nM

La presente divulgación proporciona un modelo de osteoartritis inducida por papaína en ratas que se usó para someter a prueba los efectos de PTH (1-34) en cartílago articular *in vivo* durante la progresión de la osteoartritis. En este modelo de osteoartritis inducida por papaína, la administración intraarticular de PTH (1-34) atenuó la disminución de GAG y restauró el colágeno de tipo II. Además, el tratamiento durante 5 semanas devolvió GAG a los niveles normales y potenció el colágeno de tipo II hasta niveles mayores de los normales en cartílago con osteoartritis inducida. Además, el tratamiento con PTH (1-34) durante 3-5 semanas parecía suprimir la expresión de colágeno de tipo X provocada por la inducción de osteoartritis. Además, la apoptosis de condrocitos provocada por la inducción de OA se suprimió significativamente a las 1-5 semanas del tratamiento con PTH (1-34).

Según los métodos dados a conocer en el presente documento, el tratamiento con PTH (1-34) no parecía alterar la expresión de colágeno de tipo II, colágeno de tipo X, ALP, agrecano y GAG en condrocitos articulares humanos

normales y articulaciones de rodilla de rata control (es decir, articulaciones de rodilla de rata no osteoartíticas). Los solicitantes creen, sin querer restringirse a esa creencia, que la administración de PTH (1-34) puede afectar sólo al cartílago afectado por osteoartritis. Según la presente divulgación, PTH (1-34) puede inhibir, detener o revertir la progresión de la diferenciación terminal de condrocitos articulares humanos similar a la progresión observada en osteoartritis. Por tanto, puede usarse PTH (1-34) para tratar osteoartritis en estadio temprano sin afectar a condrocitos normales.

Según la presente divulgación, puede administrarse PTH (1-34) de manera continua o periódica a un animal aquejado, por ejemplo, un ser humano que padece osteoartritis en estadio temprano, inhibiendo o previniendo de ese modo la apoptosis de condrocitos articulares y para inhibir, detener o revertir el proceso degenerativo de condrocitos articulares.

Formulación y dosificación

Una formulación para inyección puede incluir un portador que es un disolvente o un medio de dispersión. Los portadores adecuados incluyen agua, solución salina fisiológica, agua bacteriostática, Cremophor EL™ (BASF, Parsippany NJ), solución salina tamponada con fosfato (PBS), etanol, polioles (por ejemplo glicerol, glicol, propilenglicol, y similares), y mezclas de los mismos. Estas composiciones pueden ser estériles y fluidas para permitir su inyección. La fluidez puede mantenerse con un recubrimiento tal como lecitina o un tensioactivo. Puede evitarse la contaminación microbiana mediante inclusión de agentes antibacterianos y antifúngicos, tales como parabenos, clorobutanol, fenol, ácido ascórbico y timerosal. Pueden usarse azúcares y polialcoholes, tales como manitol, sorbitol, cloruro de sodio, para mantener la isotonicidad en la composición.

Tal como se da a conocer en el presente documento, la dosis terapéuticamente eficaz de PTH (1-34) (PTH humana (1-34)) para el tratamiento de osteoartritis en estadio temprano está dentro del intervalo de desde 0,1 pmol hasta 5000 pmol, dentro del intervalo de desde 0,5 pmol hasta 1500 pmol, dentro del intervalo de desde 1 pmol hasta 1000 pmol, dentro del intervalo de desde 2,5 pmol hasta 500 pmol, o dentro del intervalo de desde 5 pmol hasta 300 pmol. En determinadas realizaciones, la dosis terapéuticamente eficaz es la que proporciona una concentración inicial del agente en líquido sinovial de la articulación sinovial dentro del intervalo de desde aproximadamente 0,1 nM hasta aproximadamente 200 nM, dentro del intervalo de desde aproximadamente 0,25 nM hasta aproximadamente 100 nM, dentro del intervalo de desde aproximadamente 0,5 nM hasta aproximadamente 75 nM, dentro del intervalo de desde aproximadamente 0,75 nM hasta aproximadamente 50 nM, o dentro del intervalo de desde aproximadamente 1 nM hasta aproximadamente 25 nM. En otro aspecto, se proporciona una dosis terapéutica del agente mediante la administración de desde aproximadamente 0,1 ml hasta aproximadamente 10 ml de una disolución en la que el agente está presente a una concentración dentro del intervalo de desde aproximadamente 1 nM hasta aproximadamente 500 nM. En otro aspecto, el agente se administra en un volumen dentro del intervalo de desde aproximadamente 1 ml hasta aproximadamente 3 ml y el agente está presente en esa disolución a una concentración dentro del intervalo de desde aproximadamente 5 nM hasta aproximadamente 100 nM.

Las composiciones administradas según la presente invención pueden incluir agentes adicionales o secundarios tales como un bisfosfonato orgánico, un agente quimioterápico, un agente radiofarmacéutico, un antagonista de TNF-alfa, un fármaco antiinflamatorio no esteroideo, un esteroide, un antioxidante, un inhibidor de la angiogénesis, un inhibidor de metaloproteinasas de la matriz, una vitamina, un modulador selectivo del receptor de estrógenos (SERM), un estrógeno-progestina, un andrógeno, una calcitonina, un antibiótico, un inhibidor de catepsina K, una estatina, un antagonista del receptor de integrina, un agente anabólico de osteoblastos, o un inhibidor selectivo de la recaptación de serotonina, una glucosamina, un hialuronano o mezclas de los mismos. En determinadas realizaciones, el segundo agente es una glucosamina, un hialuronano o una mezcla de los mismos.

EJEMPLOS

Materiales y métodos

Cultivos de condrocitos articulares humanos

Se obtuvo una muestra de cartílago articular humano normal de la articulación de la rodilla de un varón asiático de 23 años que murió a causa de un accidente de tráfico. Se obtuvo otra muestra de cartílago articular de la zona normal de una articulación de rodilla obtenida de una mujer donante de 64 años con OA que se había sometido a artroplastia. Se desmenuzaron las muestras de cartílago y se digirieron secuencialmente en hialuronidasa (0,5 mg/ml), pronasa (1 mg/ml) y colagenasa (1 mg/ml). Entonces se encapsularon los condrocitos aislados en perlas de alginato. Se cultivaron quince perlas en 5 ml de medio de cultivo en cada pocillo de una placa de 6 pocillos. El medio de cultivo consistió en medio Eagle modificado de Dulbecco que contenía 100 mg/ml de ácido ascórbico, aminoácidos no esenciales, penicilina/estreptomina, insulina-transferrina-selenio al 1% y suero bovino fetal (FBS) al 10%. Se cultivaron las perlas a 37°C en un incubador de CO₂ al 5% humidificado durante 7 días antes de cada experimento, y se cambió el medio de cultivo cada 3 días.

Inducción con azaC y tratamiento con PTH de cultivos de condrocitos

Se dividieron los cultivos de condrocitos en 4 grupos. El grupo con azaC más PTH se sometió primero a inducción con azaC y después se trató con PTH. El grupo con azaC se sometió a inducción con azaC pero no se trató posteriormente con PTH. El grupo con PTH recibió PTH pero no se sometió a inducción con azaC. El grupo control no se sometió a inducción con azaC y no se trató con PTH. La inducción con azaC se usó para inducir la diferenciación terminal en condrocitos (véase por ejemplo Cell Biol Int (2006) 30(3): 288-94). En resumen, se trataron los cultivos con 15 $\mu\text{g/ml}$ de 5-azacitidina (Sigma, St. Louis, MO) durante 48 horas. El tratamiento con PTH, tras la inducción con azaC, implicó cultivar los condrocitos en medio que contenía PTH (1-34) 10 nM. Se recogieron las células de todos los grupos en los días 3, 7, y 10 del tratamiento con PTH (1-34). Se liberaron los condrocitos de las perlas de alginato cuando se disolvieron las perlas en una disolución de NaCl al 0,9% que contenía citrato de sodio 0,05 M y EDTA de sodio 0,03 M a pH 7,4. Se recogieron las células de la centrifugación a baja velocidad a 1.500 rpm durante 5 minutos.

Reacción en cadena de la polimerasa (PCR) cuantitativa en tiempo real

Se aisló el ARN total de condrocitos usando el kit RNeasy Mini (Qiagen, Valencia, CA). Se convirtió el ADN complementario (ADNc) de primera cadena a partir de 1 μg de ARN usando el kit de RT-PCR Advantage (Clontech, Palo Alto, CA). Se midieron los niveles de ARN mensajero (ARNm) para SOX9, agregano, colágeno de tipo II α 1 (Col2a1), colágeno de tipo X α 1 (Col10a1), ALP, IHH, Bcl-2 y Bax usando PCR cuantitativa en tiempo real con el sistema de detección de PCR en tiempo real Bio-Rad iQ5 (Bio-Rad, Hercules, CA), usando iQ SYBR Green Supermix (Bio-Rad, Hercules, CA). Las reacciones tuvieron lugar en una mezcla de 25 μl que contenía el ADNc, los cebadores específicos para cada gen e iQ SYBR Green Supermix.

Se detectaron los productos de PCR específicos mediante el colorante de fluorescencia de unión a ADN bicatenario SYBR Green. Se calcularon los niveles de ARNm relativos a partir del valor de ciclo umbral (Ct) de cada producto de PCR y se normalizaron con el de GAPDH usando el método de Ct comparativo. Se ajustó la cantidad relativa de la expresión de cada gen en las células control a 1 y se transformaron todas las demás con respecto a una razón. Se generó una curva de disociación (fusión) tras cada PCR para comprobar su especificidad. Se llevaron a cabo todas las amplificaciones de PCR por triplicado y se repitieron los experimentos al menos 3 veces.

Ensayo de azul de dimetilmetileno (DMMB)

Se disolvieron las perlas de alginato tal como se describió anteriormente y se digirieron adicionalmente mediante papaína (300 $\mu\text{g/ml}$) a 60°C durante 18 horas. Se cuantificaron los niveles de ADN y glucosaminoglicano sulfatado (GAG) en las muestras usando colorante Hoechst 33258 y colorante azul de 1,9-dimetilmetileno, respectivamente. se generó una curva patrón para el ensayo de DMMB usando disolución acuosa de sulfato de condroitina C (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) a concentraciones que oscilaban entre 0 y 25 $\mu\text{g/ml}$.

Tinción de TUNEL

Se midieron las células apoptóticas usando el método de tinción de TUNEL (marcaje de extremos mellados con dUTP mediado por desoxinucleotidil transferasa terminal) usando el kit de detección de muerte celular *in situ*, TMR rojo (Roche, Mannheim, Alemania). Siguiendo las directrices del fabricante, se fijaron las células con paraformaldehído al 4% en solución salina tamponada con fosfato (PBS) a una densidad celular de $1 \times 10^6/\text{ml}$ y se incubaron a temperatura ambiente durante 10 minutos, y después sedimentaron sobre un portaobjetos mediante centrifugación a una velocidad de 2.000 rpm durante 5 minutos usando una citocentrífuga (Cytospin 3; Shandon, Cheshire, RU). Se aclararon los portaobjetos dos veces con PBS y se permeabilizaron las células mediante incubación en disolución de permeabilización (Triton X-100 al 0,1% en citrato de sodio al 0,1%) durante 2 minutos sobre hielo. Se añadió la mezcla de reacción de TUNEL que contenía desoxinucleotidil transferasa terminal y rodamina (el colorante de marcaje) a los portaobjetos y se incubaron a 37°C en una cámara humidificada en la oscuridad durante 60 minutos. Se detuvo la reacción mediante una tampón de bloqueo (Triton X-100 al 0,1%/albúmina sérica bovina al 0,5% en PBS). Se contratiñeron las células mediante 4',6-diamidino-2-fenilindol (DAPI). Se observaron los portaobjetos en un microscopio de fluorescencia con una longitud de onda de excitación de 580 nm para rodamina y 365 nm para DAPI. Se tiñeron los núcleos celulares de azul mediante DAPI, y solo se tiñeron de rojo las células apoptóticas mediante rodamina. Se contaron las células teñidas en 5 campos microscópicos (1,566 mm^2/campo) en cada portaobjetos. Se analizaron los datos usando el software de análisis Image-Pro Plus (Media Cybernetics, Silver Spring, MD). Se definió la tasa de apoptosis en condrocitos como la razón de células teñidas de rojo (células apoptóticas) frente a células teñidas de azul (células totales).

Experimentos con animales

Se adquirieron cincuenta y cuatro ratas Sprague-Dawley macho de 12 semanas (250-300 gm) de BioLASCO Taiwan y se alojaron en condiciones de laboratorio convencionales (temperatura 24°C, ciclo de luz-oscuridad de 12 horas) con alimento y agua a voluntad. Se aclimató a los animales al entorno del laboratorio durante 1 semana antes de los experimentos.

Inducción de osteoartritis y tratamiento con PTH

Se dividieron las ratas en los siguientes 3 grupos: de OA (inducción de OA sin tratamiento con PTH [1-34]) (n = 18), de OA más PTH (tratamiento con PTH [1-34] seguido por la inducción de OA) (n = 18) y de PTH (tratamiento con PTH [1-34] sin inducción de OA) (n = 18). Se inyectó cada rodilla izquierda, que sirvió como articulación de control contralateral, con un vehículo sin tratamiento con PTH ni inducción de OA. Las rodillas derechas fueron las articulaciones de estudio. Se indujo la OA en las rodillas derechas de las ratas en los grupos de OA y OA más PTH con inyecciones intraarticulares de 20 μ l de disolución de papaína al 4% y 20 μ l de cisteína 0,03 M. Se administraron las inyecciones con una aguja del calibre 26 a través del tendón rotuliano en los días 1, 4 y 7 del experimento (véase por ejemplo, Nucl Med Commun (1996) 17(6): 529-35). En el grupo de OA más PTH, tras la inducción de OA, se inyectaron por vía intraarticular en las rodillas derechas 40 μ l de PTH (1-34) 10 nM cada 3 días hasta que se sacrificaron las ratas. En el grupo de PTH, se llevó a cabo el mismo tratamiento con PTH (1-34) pero sin inducción de OA. Se sacrificaron seis ratas de cada grupo mediante inhalación de CO₂ en los mismos puntos de tiempo que las ratas en el grupo de OA más PTH, en el cual se administró el tratamiento con PTH (1-34) durante 1, 3, y 5 semanas.

15 Análisis histológico

Tras haberse sacrificado las ratas, se recogieron las rodillas, y se recogieron y se fijaron las mesetas tibiales con cartílago articular con formalina tamponada neutra al 10% antes de la preparación histológica. Entonces se descalcificaron las muestras en ácido fórmico al 10%/PBS. Se incluyeron en parafina las muestras articulares de la tibia descalcificada, y se prepararon microsecciones de 5 μ m en el plano coronal. Se tiñó el GAG con safranina O-verde rápido (safranina O al 1% contrateñido con hematoxilina al 0,75% y después verde rápido al 1%) (Sigma, St. Louis MO). Se inmunotifieron el colágeno de tipo II y el colágeno de tipo X localizados. Se tiñeron con TUNEL las células apoptóticas en el cartílago.

Análisis histomorfométrico

Se tiñó de rojo el GAG mediante safranina O, y se midieron las áreas totales y teñidas de rojo en el cartílago articular de cada tibia proximal usando el software Image-Pro Plus, versión 5.0. Se calculó la razón del área teñida de rojo con respecto al área total (rojo:total) en cada grupo.

Inmunohistoquímica

Se rehidrataron las secciones articulares de tibia, y se bloqueó la peroxidasa endógena en el tejido con peróxido de hidrógeno al 3%. Se digirieron las muestras con enzimas para la recuperación de epítomos antes de la incubación con anticuerpos primarios (véase por ejemplo J Histochem Cytochem (2002) 50(8): 1049-58). La condición óptima para la digestión enzimática de la inmunotinción de colágeno de tipo II fue una mezcla de hialuronidasa al 2,5% y 1 mg/ml de pronasa en PBS (pH 7,4; Sigma) a 37°C durante 1 hora. La condición óptima para la inmunotinción de colágeno de tipo X fue 0,1 unidades/ml de condroitinasa ABC (Sigma) durante 1 hora y 1 mg/ml de pepsina en Tris HCl (pH 3,0) a 37°C durante 15 minutos. Entonces se bloquearon las secciones con suero bovino fetal (FBS) durante 1 hora y se incubaron con anticuerpos primarios frente a colágeno de tipo II (anticuerpo monoclonal de ratón; Chemicon, Temecula, CA) y colágeno de tipo X (anticuerpo policlonal de rata) (1:200; Cosmo Bio, Tokio, Japón) o (anticuerpo monoclonal de ratón) (1:100) (Sigma) a 37°C durante 4 horas o a temperatura ambiente durante 1 hora. Se incubaron los anticuerpos secundarios durante 30 minutos usando inmunoglobulina de cabra anti-ratón marcada con biotina para el colágeno de tipo II (Dako, Carpintería, CA) e inmunoglobulina de cabra anti-conejo marcada con biotina para el colágeno de tipo X (Biocare Medical, Walnut Creek, CA), y estreptavidina conjugada con peroxidasa de rábano (Dako, Carpintería CA o Biocare Medical). La tinción con una disolución de 3,3'-diaminobencidina que contenía peróxido de hidrógeno al 0,01% dio como resultado un color marrón. Finalmente, se contratiñeron las secciones con hematoxilina y se observaron al microscopio. Se midió la densidad relativa de inmunotinción (densidad/área; media del área \pm EEM: 25,44 \pm 2,77 mm²) usando el software Image-Pro Plus, versión 5.0 (Media Cybernetics).

Tinción de TUNEL para secciones articulares de tibia

Se midieron las células apoptóticas en cada sección mediante la tinción de TUNEL usando el kit de detección de muerte celular *in situ*, TMR rojo. Se rehidrataron e incubaron las secciones con proteinasa K (10 μ g/ml en Tris HCl [pH 7,4]) durante 20 minutos. Tras la permeabilización, se incubaron las secciones con pepsina (0,25% en HCl [pH 2,0]) durante 30 minutos a 37°C. El procedimiento que siguió fue el mismo que el de los cultivos de condrocitos descrito anteriormente. También se tiñeron las secciones con DAPI y hematoxilina y eosina para comprobar la localización de las células. Se contaron las células teñidas con DAPI (media \pm EEM: 150 \pm 40) en la zona central del cartílago en las mesetas tibiales. Se definió la tasa de apoptosis usando el mismo método que el usado en los cultivos de condrocitos.

55 Análisis estadístico

Se presentan los datos como la media y el EEM de los resultados de 4 muestras del estudio *in vitro* y 6 muestras del estudio *in vivo*. Se repitieron todos los experimentos al menos 3 veces. Se evaluó la significación estadística mediante el análisis de varianza unidireccional, y se llevaron a cabo comparaciones múltiples usando la prueba de Scheffe. Se consideraron significativos los valores de p inferiores a 0,05.

5 Ejemplo 1: Inhibición del proceso degenerativo de condrocitos articulares humanos (*in vitro*)

Los condrocitos articulares normales expresan colágeno de tipo II, GAG y agrecano, que se requieren para el funcionamiento adecuado del cartilago articular. Cuando experimentan diferenciación terminal, que conduce a OA, los condrocitos expresarán marcadores, incluyendo fosfatasa alcalina (ALP), Indian hedgehog (IHH) y colágeno de tipo X, mientras que la expresión de colágeno de tipo II y agrecano descenderá. Este proceso degenerativo puede conducir a la mineralización de los condrocitos y finalmente a la muerte celular.

Las figuras 1A-1F muestran los cambios en los niveles de (A) ARNm para agrecano, (B) glucosaminoglicano (GAG), (C) colágeno de tipo II α 1 (Col2a1), (D) colágeno de tipo X α 1 (Col10a1), (E) fosfatasa alcalina (ALP) y (F) Indian hedgehog (IHH) en los condrocitos articulares humanos tras el tratamiento con la sustancia relacionada con la hormona paratiroidea PTH (1-34). Las células se dejaron sin tratar (control), se trataron solo con PTH, se trataron solo con azaC, o se trataron tanto con azaC como con PTH. Las células de todos los grupos se recogieron cuando el grupo con azaC más PTH alcanzó los días 3, 7, y 10 del tratamiento con PTH. Se cuantificó la expresión de ARNm mediante reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real. Las barras muestran la media y el EEM de 4 cultivos por duplicado. Se repitieron todos los experimentos al menos 3 veces. Se evaluaron los datos mediante el análisis de varianza unidireccional, y se llevaron a cabo comparaciones múltiples usando el método de Scheffe. * = $P < 0,05$; ** = $P < 0,01$ frente al control; # = $P < 0,05$; ## = $P < 0,01$.

Se aisló el ARN total de los condrocitos y se preparó el ADN complementario (ADNc) de primera cadena tal como se describió anteriormente en materiales y métodos. Se midieron los niveles de ARN mensajero (ARNm) para SOX9, agrecano, colágeno de tipo II α 1 (Col2a1), colágeno de tipo X α 1 (Col10a1), ALP, IHH, Bcl-2 y Bax usando PCR cuantitativa en tiempo real con el sistema de detección de PCR en tiempo real Bio-Rad iQ5 (Bio-Rad, Hercules, CA), usando iQ SYBR Green Supermix (Bio-Rad, Hercules, CA). Las reacciones tuvieron lugar en una mezcla de 25 μ l que contenía el ADNc, los cebadores específicos para cada gen y iQ SYBR Green Supermix.

Las condiciones de ciclación fueron tal como sigue: para colágeno de tipo II α 1 (Col2a1), colágeno de tipo X α 1 (Col10a1) y gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa (GAPDH), las condiciones de ciclación fueron de 1 ciclo a 95°C durante 3 min, seguido por 40 ciclos de 95°C durante 10 s, 61°C durante 30 s y 55°C durante 1 min; o ALP, las condiciones de ciclación fueron de 1 ciclo a 95°C durante 3 min, seguido por 40 ciclos a 95°C durante 10 s, 65°C durante 30 s y 55°C durante 1 min. Las secuencias de cebador fueron tal como sigue: (i) colágeno de tipo II α 1 (producto de 81 pb): Cebador directo: 5'-CAA CAC TGC CAA CGT CCA GAT-3', designado como SEQ ID NO: 1; Cebador inverso: 5'-TCT TGC AGT GGT AGG TGA TGT TCT-3', designado SEQ ID NO: 2. (ii) colágeno X α 1 (producto de 85 pb): Cebador directo: 5'-CAG ATT TGA GCT ATC AGA CCA ACA A-3', designado como SEQ ID NO: 3; Cebador inverso: 5'-AAA TTC AAG AGA GGC TTC ACA TAC G-3', designado como SEQ ID NO: 4. (iii) GAPDH (producto de 126 pb): Cebador directo: 5'-TCT CCT CTG ACT TCA ACA GCG AC-3', designado como SEQ ID NO: 5; Cebador inverso: 5'-CCC TGT TGC TGT AGC CAA ATT C-3', designado como SEQ ID NO: 6. (iv) fosfatasa alcalina (producto de 64 pb): Cebador directo: 5'-AAC TTC CAG ACC ATT GGC TTG A-3'; designado como SEQ ID NO: 7; Cebador inverso: 5'-TTG CCG CGT GTC GTG TT-3', designado como SEQ ID NO: 8. (v) agrecano (producto de 189 pb): Cebador directo: 5'- ACA GCT GGG GAC ATT AGT GG -3', designado como SEQ ID NO: 9; Cebador inverso: 5'- GTG GAA TGC AGA GGT GGT TT -3', designado como SEQ ID NO: 10. (vi) Indian hedgehog (producto de 82 pb): Cebador directo: 5'- TCA TCT TCA AGG ACG AGG AG-3', designado como SEQ ID NO: 11; Cebador inverso: 5'- ATA GCC AGC GAG TTC AGG -3', designado como SEQ ID NO: 12. (vii) Bcl-2 (producto de 254 pb): Cebador directo: 5'- TCA TCT TCA AGG ACG AGG AG-3', designado como SEQ ID NO: 13; Cebador inverso: 5'- ATA GCC AGC GAG TTC AGG-3', designado como SEQ ID NO: 14. (viii) Bax (producto de 161 pb): Cebador directo: 5'- TTT GCT TCA GGG TTT CAT CC designado como SEQ ID NO: 15; Cebador inverso: 5'- TCC TCT GCA GCT CCA TGT TA designado como SEQ ID NO: 16.

Se detectaron los productos de PCR específicos mediante la fluorescencia de SYBR Green, el colorante de unión a ADN bicatenario (Biotechniques (1998) 24(6): 954-8, 960, 962). Se calculó el nivel de expresión de ARNm relativo a partir del valor de ciclo umbral (Ct) de cada producto de PCR y se normalizó con el de la GAPDH usando el método de Ct comparativo (Methods (2001) 25(4): 402-8). Se ajustó la cantidad relativa de expresión de cada gen de las células control el día 3 tras la inducción con azaC al 100%, y se transformaron todas las demás hasta un cambio de porcentaje con respecto a la base. Tras la reacción de PCR, se generó una curva de disociación (fusión) para comprobar la especificidad de la reacción de PCR. Se llevaron a cabo todas las amplificaciones de PCR por triplicado, y se repitieron los experimentos al menos 3 veces.

La expresión de los genes de agrecano, Col2a1 (colágeno de tipo II), Col10a1 (colágeno de tipo X), ALP e IHH en el grupo con PTH no fue significativamente diferente de la del grupo control tras 3-10 días de tratamiento con PTH (1-34) (figuras 1A y 1C-1F). En el grupo con azaC, los niveles de ARNm de agrecano y Col2a1 fueron más bajos que

los del grupo control tras 3 días y 7 días de inducción con azaC (figuras 1A y 1C). Tras 3 días de inducción con azaC, los niveles de agrecano fueron el 56% del control ($P < 0,05$) y los niveles de Col2a1 fueron el 46,3% del control ($P < 0,01$). Tras 7 días de inducción con azaC, los niveles de agrecano fueron el 31% del control ($P < 0,01$) y los niveles de Col2a1 fueron el 64,8% del control ($P < 0,05$). Además, los niveles de Col10a1 (2,3-2,4 veces los del control) y ALP (5,3-10,9 veces los del control) en el grupo con azaC fueron significativamente más altos que los del grupo control 7 y 10 días tras la inducción con azaC ($P < 0,01$) (figuras 1D y 1E). La expresión de IHH también fue significativamente elevada 3, 7 y 10 días tras la inducción con azaC (los niveles fueron 6,5 veces los del control tras 3 días de inducción con azaC [$P < 0,01$], 2,6 veces los del control tras 7 días de inducción con azaC [$P < 0,05$] y 2,7 veces los del control tras 10 días de inducción con azaC [$P < 0,05$]) (figura 1F). En el grupo con azaC más PTH, el tratamiento con PTH (1-34) durante 3, 7 y 10 días tras la inducción con azaC revirtió los cambios inducidos por azaC en los niveles de ARNm de Col2a1, Col10a1, ALP, IHH, y agrecano (excepto en los cultivos de 10 días de Col2a1 y agrecano) (figura 1). El nivel de ARNm de agrecano en el grupo con azaC más PTH fue significativamente más alto que el del grupo con azaC tras 3 y 7 días de tratamiento ($P < 0,05$ para 3 días de tratamiento y $P < 0,01$ para 7 días de tratamiento) y no fue significativamente diferente del grupo control. Sin embargo, tras 10 días de tratamiento con PTH, el nivel de agrecano no fue diferente del del grupo con azaC, que fue más bajo que el de los cultivos control ($P < 0,05$) (figura 1A). El nivel de expresión de Col2a1 en el grupo con azaC más PTH fue significativamente más alto que el del grupo con azaC tras 3 días de tratamiento con PTH (1-34) ($P < 0,05$) y no fue significativamente diferente del del grupo control. Tras 7 días de tratamiento con PTH (1-34), el nivel de expresión de Col2a1 en el grupo con azaC más PTH fue más alto de lo que estaba tanto en el grupo con azaC ($P < 0,01$) como en el grupo control ($P < 0,05$) (figura 1C). Sin embargo, tras 10 días de tratamiento con PTH (1-34), no se encontró una diferencia significativa entre los 3 grupos. Los cambios en los niveles de ARNm de Col10a1, ALP e IHH inducidos por azaC se eliminaron significativamente en los cultivos con azaC más PTH tras el tratamiento con PTH (1-34) ($P < 0,01$ para Col10a1 y ALP tras 3, 7 y 10 días de tratamiento; $P < 0,01$ para IHH tras 3 días de tratamiento; $P < 0,05$ para IHH tras 7 y 10 días de tratamiento) (figuras 1D-1F). De especial interés, en el día 3 del tratamiento con PTH(1-34), la expresión de Col10a1 y ALP fue más baja en los cultivos con azaC más PTH de lo que lo fue en los cultivos control ($P < 0,01$) (figura 1D y figura 1E). Sin embargo, en el día 7 del tratamiento, no se encontró una diferencia significativa entre los grupos control y azaC más PTH en la expresión de cualquiera de los genes. En el día 10 de tratamiento, la expresión de ALP en los cultivos con azaC más PTH fue más alta que la de los cultivos control ($P < 0,05$) (figura 1E). El nivel de ARNm para IHH en el grupo con azaC más PTH fue un 47-71% más bajo que el de los cultivos control tras 3-10 días de tratamiento con PTH (1-34), pero solo las diferencias tras 10 días fueron casi estadísticamente significativas (figura 1 F).

Los niveles de GAG en los cultivos de condrocitos no fueron significativamente diferentes entre los grupos con PTH y control. Los niveles de GAG en el grupo con azaC fueron significativamente más bajos que los del control a los 3 y 7 días tras la inducción con azaC ($P < 0,01$) (figura 1B). Los niveles de GAG en el grupo con azaC más PTH fueron significativamente más altos de lo que estaban en el grupo con azaC a los 3, 7 y 10 días tras el tratamiento con PTH(1-34) ($P < 0,01$). Aunque la expresión de ARNm para agrecano no se revirtió mediante PTH (1-34) tras 10 días de tratamiento en el grupo con azaC más PTH (figura 1A), los niveles de GAG en el grupo con azaC más PTH seguían siendo más altos de lo que lo estaban en el grupo control tras 7 y 10 días ($P < 0,01$) (figura 1B). Las expresiones disminuidas de los genes de Col10a1, ALP e IHH, agrecano, Col2a1 y GAG observadas durante el tratamiento de los condrocitos articulares humanos que padecieron OA inducida por azaC con PTH, indican que el tratamiento con PTH puede revertir el proceso degenerativo de condrocitos articulares humanos e inhibir la diferenciación terminal de los condrocitos. Además, las expresiones de agrecano, Col2a1 y GAG no resultaron significativamente afectadas por el tratamiento de PTH con respecto a condrocitos articulares humanos normales, lo que indica que puede usarse PTH o sustancia derivada de PTH para tratar la OA en estadio temprano sin afectar a los condrocitos normales.

Ejemplo 2: Inhibición de la apoptosis de condrocitos articulares humanos (*in vitro*)

Bcl-2 y Bax son miembros de una familia de proteínas citoplasmáticas que regulan la apoptosis. Las dos proteínas tienen secuencias de aminoácidos altamente similares pero son funcionalmente opuestas: Bcl-2 actúa inhibiendo la apoptosis, mientras que Bax contrarresta este efecto (Hunter, J Biol Chem. (1996) 271(15):8521-4).

Las figuras 2A-2C muestran los cambios en (A) la expresión de ARNm para Bcl-2, (B) la expresión de ARNm para Bax y (C) la razón de Bcl-2 con respecto a Bax en condrocitos articulares humanos tras el tratamiento con hormona paratiroidea (PTH). Las células se dejaron sin tratar (control), se trataron con PTH sola, se trataron con azaC sola o se trataron tanto con azaC como con PTH. Se recogieron las células de todos los grupos cuando el grupo de azaC más PTH alcanzó los días 3, 7, 10 y 14 de tratamiento con PTH. Se cuantificó la expresión de ARNm mediante reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real. Las barras muestran la media y el EEM de 4 cultivos por duplicado. Se repitieron todos los experimentos al menos 3 veces. Se evaluaron los datos mediante análisis de la varianza unidireccional, y se llevaron a cabo comparaciones múltiples usando el método de Scheffe. * = $P < 0,05$; ** = $P < 0,01$ frente al control; # = $P < 0,05$; ## = $P < 0,01$.

Para estudiar los cambios en la expresión de Bcl-2 y Bax a lo largo de un periodo de tiempo más largo, se añadió un grupo de 14 días. En el grupo de PTH, la expresión de Bcl-2 y Bax no mostró cambios significativos en comparación

con los cultivos control. Aunque la expresión de Bcl-2 fue 1,7 veces la del control tras 3-10 días de tratamiento, no se encontraron diferencias estadísticamente significativas. En el grupo de azaC, el nivel de ARNm de Bcl-2 aumentó significativamente 3 y 10 días tras la inducción con azaC (3,2 veces el del control tras 3 días de tratamiento [$P < 0,05$]; 4,7 veces el del control tras 10 días de tratamiento [$P < 0,01$]) (figura 2A). En el grupo de azaC más PTH, la expresión de Bcl-2 también fue más alta que la de los cultivos control (2,1 veces la del control tras 3 días de tratamiento [$P < 0,05$]; 2,1 veces el control tras 7 días de tratamiento [$P < 0,05$]; y 6,0 veces el control tras 10 días de tratamiento [$P < 0,01$]), indicando que el tratamiento con PTH no pudo revertir el efecto de azaC sobre la expresión de Bcl-2. Tras 14 días de tratamiento con PTH, la expresión de Bcl-2 no fue significativamente diferente entre los grupos (figura 2A). El nivel de expresión de ARNm de Bax disminuyó ligeramente (61-88% del control) tanto en el grupo de azaC como en el de azaC más PTH tras 3-10 días de tratamiento con PTH, pero la diferencia no fue estadísticamente significativa. Sin embargo, 14 días tras la inducción con azaC, la expresión de Bax en el grupo de azaC aumentó significativamente (2,1 veces la del control [$P < 0,01$]), y la expresión de Bax en el grupo de azaC más PTH siguió siendo 1,6 veces la de los cultivos control, indicando que el tratamiento con PTH no pudo revertir completamente el efecto de azaC sobre la expresión de Bax (figura 2B). La razón de Bcl-2 con respecto a Bax fue más alta en los grupos de azaC y azaC más PTH que en el grupo control tras 3 días ($P < 0,05$) y 10 días ($P < 0,01$) de tratamiento con PTH. No se encontraron diferencias significativas en la razón de Bcl-2:Bax entre los grupos de azaC y azaC más PTH tras 7 ó 14 días de tratamiento con PTH (figura 2C). Cuando se produce la apoptosis de condrocitos en un paciente, por ejemplo que padecía de OA en estadio tardío, el tratamiento con PTH no puede revertir la muerte celular.

Se compararon las tasas de apoptosis en cultivos de condrocitos articulares humanos en los grupos control, azaC y azaC más PTH tras 14 días de tratamiento con PTH (1-34) (para el grupo de azaC más PTH), usando tinción de TUNEL.

La figura 3 muestra el efecto de la hormona paratiroidea sobre la apoptosis inducida por azaC en condrocitos articulares humanos. Se compararon las tasas de apoptosis en células control, células tratadas con azaC sola y células tratadas con azaC más PTH. Las barras muestran la media y el EEM de 4 cultivos por duplicado. Se evaluaron los datos mediante el análisis de la varianza unidireccional, y se llevaron a cabo comparaciones múltiples usando el método de Scheffe. ** = $P < 0,01$ frente al control; ## = $P < 0,01$.

Las tasas de apoptosis en condrocitos articulares humanos fueron significativamente más altas en los cultivos con azaC que en los cultivos control (aumento de 4,8 veces, $P < 0,01$). Las tasas de apoptosis en los cultivos con azaC más PTH fueron significativamente más bajas que en los cultivos con azaC ($P < 0,01$) pero todavía más altas que en los cultivos control (aumento de 3,1 veces, $P < 0,01$) (figura 3). Aunque el tratamiento con PTH no puede revertir la apoptosis de condrocitos una vez iniciada la apoptosis, puede prevenir la muerte de condrocitos y reducir las tasas de apoptosis revirtiendo el proceso degenerativo de los condrocitos cuando se encuentran en el estadio temprano de progreso de la OA.

Ejemplo 3: Inhibición del proceso degenerativo de condrocitos articulares en un modelo animal de rata

La figura 4 muestra el efecto de la hormona paratiroidea sobre los niveles de glucosaminoglucano (GAG) en el cartílago articular de rata normal y osteoartrítica (OA). Se midieron el cartílago articular teñido con safranina O en la tibia proximal de las articulaciones de control contralaterales de ratas en el grupo de OA y las articulaciones de estudio de ratas en los grupos de OA, OA más PTH y PTH para determinar la razón de área teñida con safranina O con respecto a área total. Se compararon las razones de área teñida con safranina O con respecto a área total (rojo/total) entre todos los grupos tras 1, 3 y 5 semanas de tratamiento con PTH. Las barras muestran la media y el EEM de 6 muestras. Se evaluaron los datos mediante análisis de la varianza unidireccional, y se llevaron a cabo comparaciones múltiples usando el método de Scheffe. ** = $P < 0,01$ frente a las articulaciones de estudio en el grupo de OA en cada punto de tiempo; ## = $P < 0,01$.

Se generaron fotomicrografías del cartílago articular teñido con safranina O (positivo para GAG) de las articulaciones de control contralaterales de ratas en el grupo de OA, así como de las articulaciones de estudio de ratas en los grupos de OA, OA más PTH y PTH según los métodos mencionados anteriormente. Se midió la razón de área teñida con safranina O con respecto a área total (rojo:total) y se comparó entre los grupos (figura 4). La razón de rojo:total del cartílago de control contralateral en los grupos de OA, OA más PTH y PTH no fue significativamente diferente entre los 3 grupos en ningún punto de tiempo. La razón de rojo:total en el cartílago de la articulación de estudio en el grupo de OA fue significativamente más baja que la del cartílago de control contralateral 1, 3 y 5 semanas tras la inducción de OA ($P < 0,01$) (figura 4). La razón de rojo:total en el cartílago de estudio en el grupo de OA más PTH también fue significativamente más baja que la del control contralateral tras 1 y 3 semanas de tratamiento con PTH (1-34) tras la inducción de OA ($P < 0,01$). Sin embargo, la razón aumentó a lo largo del tiempo. Tras 5 semanas de tratamiento con PTH (1-34), el cartílago del grupo de OA más PTH no fue significativamente diferente del cartílago de control contralateral (figura 4). La razón de rojo:total en el grupo de OA más PTH fue significativamente más alta que la del grupo OA de tras 1, 3 y 5 semanas de tratamiento con PTH (1-34) ($P < 0,01$) (figura 4). En el grupo de PTH, no hubo diferencias significativas entre el cartílago de estudio y el cartílago de control contralateral en ningún punto de tiempo (figura 4).

Se generaron fotomicrografías del cartílago articular teñido inmunohistoquímicamente de las articulaciones de control contralaterales de ratas en el grupo de OA, así como de las articulaciones de estudio de ratas en los grupos de OA y OA más PTH según los métodos mencionados anteriormente. El análisis inmunohistoquímico mediante la cuantificación de la densidad relativa mostró que la densidad de colágeno de tipo II inmunolocalizado del cartílago de control contralateral no fue significativamente diferente entre los 3 grupos.

La figura 5 muestra el efecto de la hormona paratiroidea sobre colágeno de tipo II inmunolocalizado en el cartílago articular de rata normal y osteoartrítica (OA). Se midieron el cartílago articular inmunoteñido con colágeno de tipo II para el cartílago articular en la tibia proximal de las articulaciones de control contralaterales de ratas en el grupo de OA y las articulaciones de estudio de ratas en los grupos de OA y OA más PTH. Se tiñó el cartílago de placa de crecimiento como control positivo. Se usaron la placa de crecimiento y las muestras de cartílago articular que se tiñeron sin anticuerpo primario como control negativo. Se compararon las densidades relativas en el cartílago de control contralateral, cartílago con OA y cartílago con OA tratado con PTH tras 3 y 5 semanas de tratamiento. Las barras muestran la media y el EEM de 6 muestras. Se evaluaron los datos mediante análisis de la varianza unidireccional, y se llevaron a cabo comparaciones múltiples usando el método de Scheffe. * = $P < 0,05$; ** = $P < 0,01$, frente a las articulaciones de estudio en el grupo de OA en cada punto de tiempo; #= $P < 0,05$.

Se eliminó significativamente el colágeno de tipo II inmunolocalizado en el cartílago de estudio de ratas en el grupo de OA 3 y 5 semanas tras la inducción de OA en comparación con el cartílago de control contralateral ($P < 0,05$). En el cartílago de estudio del grupo de OA más PTH, la densidad de colágeno de tipo II inmunolocalizado fue significativamente más alta que la del grupo de OA ($P < 0,05$), pero no fue diferente de la del cartílago de control contralateral tras 3 semanas de tratamiento con PTH (1-34) tras la inducción de OA (figura 5). Tras 5 semanas de tratamiento con PTH (1-34), la densidad de colágeno de tipo II inmunolocalizado en el cartílago de estudio del grupo de OA más PTH fue significativamente más alta no solo que la del grupo de OA ($P < 0,01$) sino que también que la del control contralateral del grupo de OA más PTH ($P < 0,05$). Se encontró colágeno de tipo X inmunolocalizado predominantemente en condrocitos articulares del grupo de OA, pero fue menos evidente en el cartílago del grupo de OA más PTH tras 3 y 5 semanas de tratamiento con PTH (1-34). No se encontraron condrocitos con colágeno de tipo X teñido obvios en el cartílago de control contralateral. Cuando se trataron con PTH ratas que padecían OA inducida por papaína, las expresiones de GAG, colágeno de tipo II y colágeno de tipo X también indicaban el efecto de revertir el proceso degenerativo de los condrocitos articulares.

Ejemplo 4: Inhibición de la apoptosis de condrocitos articulares en un modelo animal de rata

Se generaron fotomicrografías representativas del cartílago articular teñido con TUNEL de las articulaciones de control contralaterales de ratas en el grupo de OA, así como de las articulaciones de estudio de ratas en los grupos de OA y OA más PTH según los métodos mencionados anteriormente.

La figura 6 muestra el efecto de la hormona paratiroidea sobre la apoptosis de condrocitos en el cartílago articular de rata normal y osteoartrítica (OA). Se midieron los cartílagos articulares teñidos con TUNEL y teñidos con 4',6-diamidino-2-fenilindol (DAPI) en la tibia proximal de las articulaciones de control contralateral de ratas en el grupo de OA y las articulaciones de estudio de ratas en los grupos de OA y OA más PTH tras 1, 3 y 5 semanas de tratamiento con PTH. Se compararon las tasas de apoptosis en articulaciones de control contralaterales, articulaciones con OA y articulaciones con OA tratadas con PTH. Las barras muestran la media y el EEM de 6 muestras. Se evaluaron los datos mediante análisis de la varianza unidireccional, y se llevaron a cabo comparaciones múltiples usando el método de Scheffe. * = $P < 0,05$; ** = $P < 0,01$, frente a las articulaciones de estudio en el grupo de OA en cada punto de tiempo; #= $P < 0,05$; ##= $P < 0,01$.

Los resultados indicaron que la tasa de apoptosis de las células del cartílago de estudio del grupo de OA fue significativamente más alta que la del cartílago de control contralateral 3 semanas ($P < 0,05$) y 5 semanas ($P < 0,01$) tras la inducción de OA (figura 6). En el grupo de OA más PTH, la tasa de apoptosis de los condrocitos del cartílago de estudio fue significativamente más baja que la del grupo de OA ($P < 0,01$), y no mostró una diferencia significativa con el cartílago de control contralateral (figura 6). Por tanto, cuando se trataron ratas que padecían OA inducida por papaína con PTH, se previno la muerte de los condrocitos y se redujeron las tasas de apoptosis.

Tal como se da a conocer en el presente documento, se usaron el modelo de cultivo con diferenciación terminal de condrocitos inducida por azaC (que imita el cambio de OA) y el modelo de rata con OA inducida por papaína para demostrar que la hormona paratiroidea (PTH) puede usarse para tratar osteoartritis en estadio temprano, prevenir la apoptosis de condrocitos articulares y revertir un proceso degenerativo de condrocitos articulares. Adicionalmente, según los métodos de la presente divulgación, se usó el modelo de rata con OA inducida por papaína para demostrar el tratamiento de la OA en estadio temprano con PTH mediante inyección intraarticular.

Ejemplo 5: Intervalo de dosis para la inhibición del proceso degenerativo de condrocitos articulares en un modelo animal de rata

La figura 7 muestra el efecto de la hormona paratiroidea sobre los niveles de glucosaminoglucanos (GAG) en el cartílago articular de rata normal y osteoartrítica (OA) tras el tratamiento después de 5 semanas de tratamiento. Los

métodos son tal como se describieron anteriormente en las secciones tituladas "Experimentos con animales" e "Inducción de osteoartritis y tratamiento con PTH" excepto porque la concentración de la dosis de PTH (1-34) administrada fue de 5 nM, 10 nM o 100 nM. Se miden el cartílago articular teñido con safranina O en la tibia proximal de las articulaciones de control contralaterales de ratas en el grupo OA y las articulaciones de estudio de ratas en los grupos de OA y OA más PTH para determinar la razón de área teñida con safranina O con respecto a área total. Se comparan las razones de área teñida con safranina O con respecto a área total (rojo/total) entre todos los grupos tras 5 semanas de tratamiento con PTH. Las barras muestran la media y el EEM de 6 muestras. Se evalúan los datos mediante análisis de la varianza unidireccional, y se llevan a cabo comparaciones múltiples usando el método de Scheffe. * * =P<0,01: las articulaciones de control frente a las articulaciones de estudio en el grupo de OA en los puntos de tiempo indicados; ###=P < 0,01: las articulaciones con OA frente a las articulaciones de estudio en los grupos de de OA más PTH 5 nM, OA más PTH 10 nM y OA más PTH 100 nM.

Se generaron fotomicrografías del cartílago articular teñido con safranina O (positivo para GAG) de las articulaciones de control contralaterales de ratas en el grupo de OA, así como de las articulaciones de estudio de ratas en los grupos de OA y OA más PTH según los métodos mencionados anteriormente. Se mide la razón de área teñida con safranina O con respecto a área total (rojo:total) y se comparó entre los grupos (figura 7). La razón de rojo:total del cartílago de control contralateral en los grupos de OA y OA más PTH no fue significativamente diferente entre los 3 grupos. La razón de rojo:total en el cartílago de la articulación de estudio en el grupo de OA fue significativamente más baja que la del cartílago de control contralateral 5 semanas tras la inducción de OA (P < 0,01) (figura 7). Tras 5 semanas de tratamiento con PTH (1-34), el cartílago del grupo de OA más PTH no fue significativamente diferente del cartílago de control contralateral (figura 7), es decir, la razón de rojo:total en el grupo de OA más PTH fue significativamente más alta que la del grupo de OA tras 5 semanas de tratamiento con PTH (1-34) (P < 0,01) (figura 7). Estos resultados muestran que el tratamiento con PTH (1-34) 5, 10 y 100 nM durante 5 semanas (inyección cada tres días) puede producir una supresión significativa de la pérdida de GAG. El nivel de GAG del grupo de OA es significativamente más bajo que el del grupo control (p<0,01). Los niveles de GAG observados tras el tratamiento con PTH (1-34) 5, 10 ó 100 nM son significativamente más altos que los del grupo de OA (p<0,01). Además, no existe una diferencia significativa entre el grupo control y los grupos tratados con PTH.

Aunque se ha descrito la invención a modo de ejemplo y en cuanto a las realizaciones preferidas, debe entenderse que la invención no se limita a las realizaciones dadas a conocer. Al contrario, se pretenden cubrir diversas modificaciones y disposiciones similares (tal como les resultarían evidentes a los expertos en la técnica). Por tanto el alcance de las reivindicaciones adjuntas debe ser según la interpretación más amplia de manera que abarque todas las modificaciones y disposiciones similares de este tipo.

Lista de secuencias

<110> KAOHSIUNG MEDICAL UNIVERSITY

35 <120> TRATAMIENTO DE OSTEOARTRITIS EN ESTADIO TEMPRANO

<130> 383295-001WO

<140>

40 <141>

<150> 12/336,209

<151> 16-12-2008

45 <160> 17

<170> PatentIn versión 3.5

<210> 1

50 <211> 21

<212> ADN

<213> Secuencia Artificial

<220>

55 <223> Descripción de Secuencia Artificial: Cebador sintético

<400> 1

caacactgcc aacgtccaga t

5	<210> 2 <211> 24 <212> ADN <213> Secuencia Artificial	
	<220> <223> Descripción de Secuencia Artificial: Cebador sintético	
10	<400> 2 tcttgca ^{tg} gtaggtgat ^g ttct	24
15	<210> 3 <211> 25 <212> ADN <213> Secuencia Artificial	
20	<220> <223> Descripción de Secuencia Artificial: Cebador sintético	
25	<400> 3 cagattgag ctatcagacc aaca ^a	25
30	<210> 4 <211> 25 <212> ADN <213> Secuencia Artificial	
35	<220> <223> Descripción de Secuencia Artificial: Cebador sintético	
40	<400> 4 aaattcaaga gaggcttcac atac ^g	25
45	<210> 5 <211> 23 <212> ADN <213> Secuencia Artificial	
50	<220> <223> Descripción de Secuencia Artificial: Cebador sintético	
55	<400> 5 tctcctctga ctcaacagc gac	23
60	<210> 6 <211> 22 <212> ADN <213> Secuencia Artificial	
65	<220> <223> Descripción de Secuencia Artificial: Cebador sintético	
70	<400> 6 ccctgttgct gtagccaaat tc	22

5	<210> 7 <211> 22 <212> ADN <213> Secuencia Artificial	
	<220> <223> Descripción de Secuencia Artificial: Cebador sintético	
10	<400> 7 aactccaga ccattggctt ga	22
15	<210> 8 <211> 17 <212> ADN <213> Secuencia Artificial	
	<220> <223> Descripción de Secuencia Artificial: Cebador sintético	
20	<400> 8 ttgccgctg tcgtgtt	17
25	<210> 9 <211> 20 <212> ADN <213> Secuencia Artificial	
	<220> <223> Descripción de Secuencia Artificial: Cebador sintético	
30	<400> 9 acagctggg acattagtg	20
35	<210> 10 <211> 20 <212> ADN <213> Secuencia Artificial	
	<220> <223> Descripción de Secuencia Artificial: Cebador sintético	
40	<400> 10 gtggaatga gagtggtt	20
45	<210> 11 <211> 20 <212> ADN <213> Secuencia Artificial	
	<220> <223> Descripción de Secuencia Artificial: Cebador sintético	
50	<400> 11 tcatctcaa ggacgaggag	20
55	<210> 12 <211> 18	

	<212> ADN	
	<213> Secuencia Artificial	
	<220>	
5	<223> Descripción de Secuencia Artificial: Cebador sintético	
	<400> 12	
	atagccagcg agttcagg	18
10	<210> 13	
	<211> 20	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia Artificial	
15	<220>	
	<223> Descripción de Secuencia Artificial: Cebador sintético	
	<400> 13	
20	tcatcttcaa ggacgaggag	20
	<210> 14	
	<211> 18	
25	<212> ADN	
	<213> Secuencia Artificial	
	<220>	
	<223> Descripción de Secuencia Artificial: Cebador sintético	
30	<400> 14	
	atagccagcg agttcagg	18
35	<210> 15	
	<211> 20	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia Artificial	
40	<220>	
	<223> Descripción de Secuencia Artificial: Cebador sintético	
	<400> 15	
45	tttgcttcag ggttcatcc	20
	<210> 16	
	<211> 20	
	<212> ADN	
50	<213> Secuencia Artificial	
	<220>	
	<223> Descripción de Secuencia Artificial: Cebador sintético	
55	<400> 16	
	tcctctgcag ctccatgta	20
60	<210> 17	
	<211> 34	
	<212> PRT	

ES 2 575 477 T3

<213> Homo sapiens

<400> 17

5 Ser Val Ser Glu Ile Gln Leu Met His Asn Leu Gly Lys His Leu Asn
1 5 10 15

10 Ser Met Glu Arg Val Glu Trp Leu Arg Lys Lys Leu Gln Asp Val His
20 25 30

Asn Phe

REIVINDICACIONES

1. Aminoácidos 1-34 de la hormona paratiroidea para su uso en el tratamiento de osteoartritis en estadio temprano en un ser humano mediante la inyección intraarticular de los aminoácidos 1-34 de la hormona paratiroidea en el intervalo de dosis terapéuticamente eficaz de 0,1 pmol a 5000 pmol.
- 5 2. Aminoácidos 1-34 de la hormona paratiroidea para su uso según la reivindicación 1, que se proporciona mediante la administración de una dosis terapéuticamente activa de desde 5 pmol hasta 300 pmol.

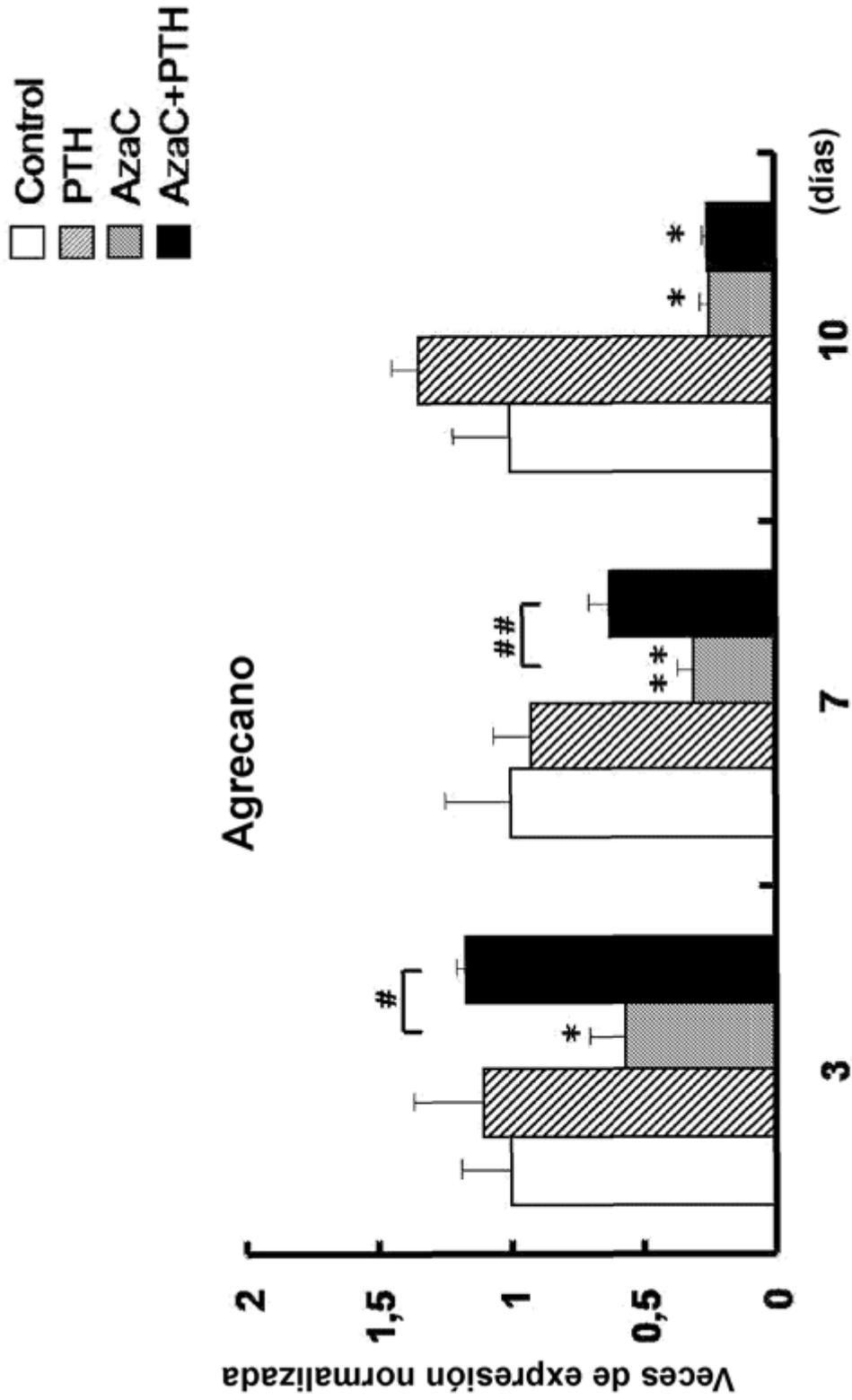


FIG. 1A

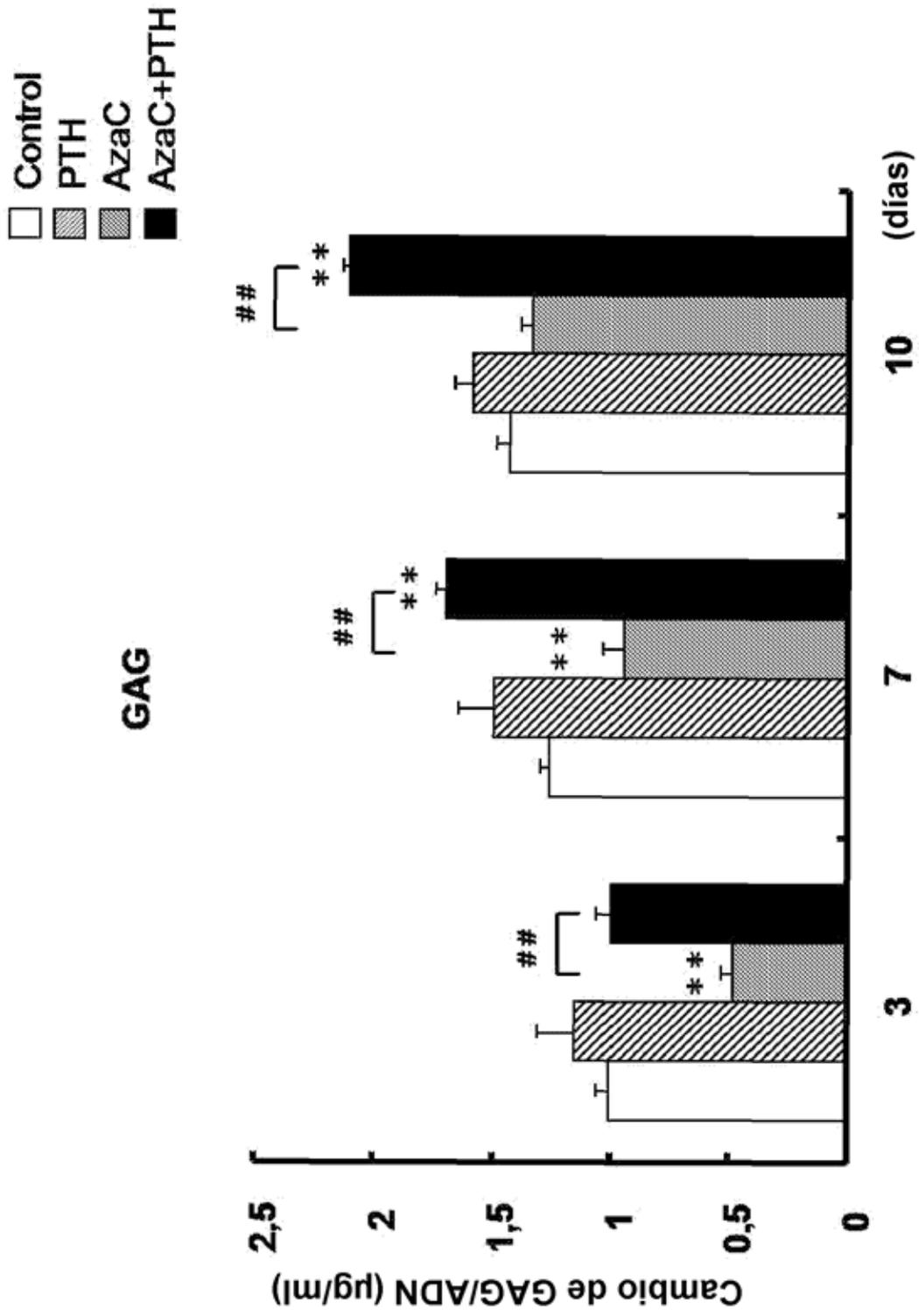


FIG. 1B

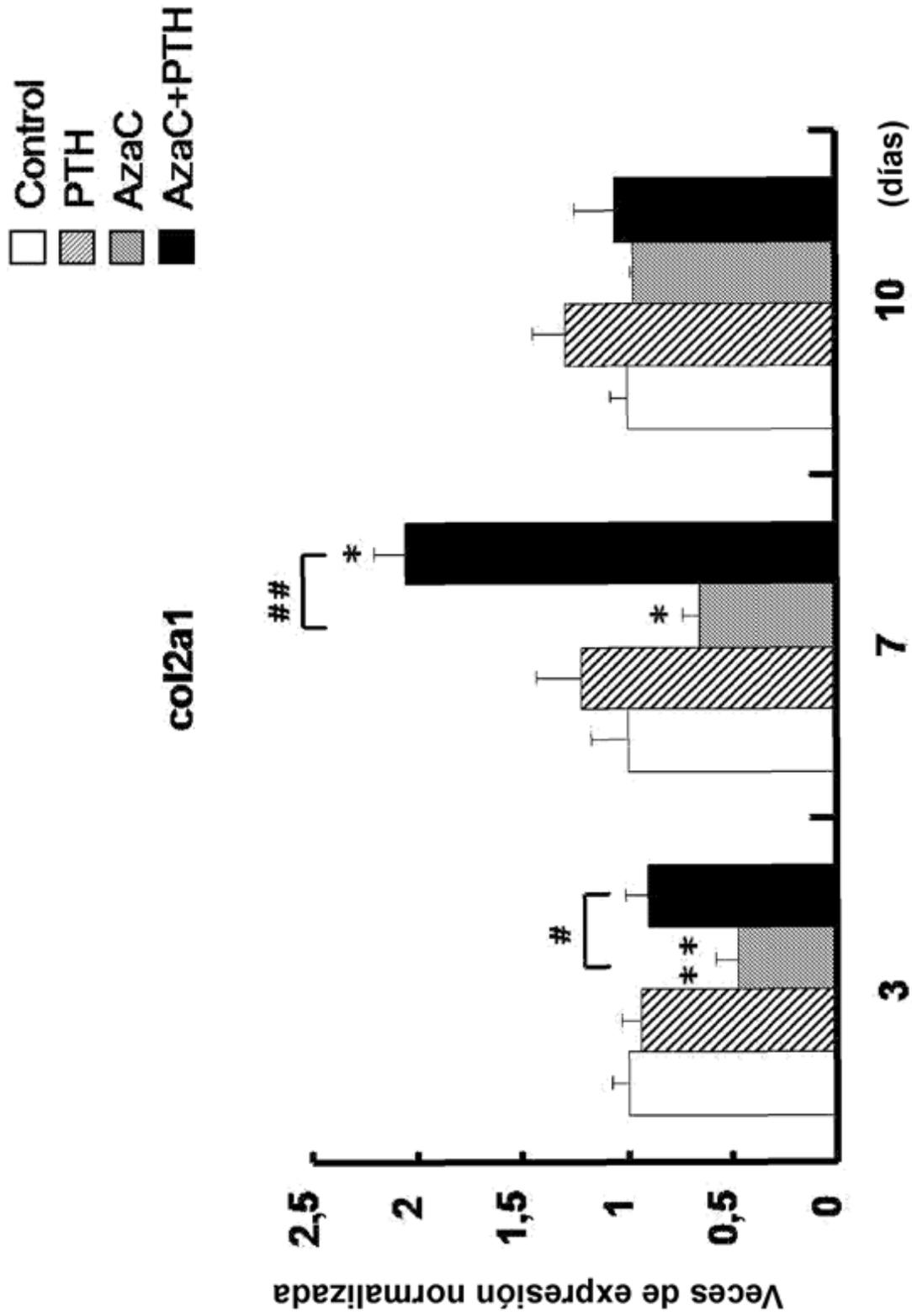


FIG. 1C

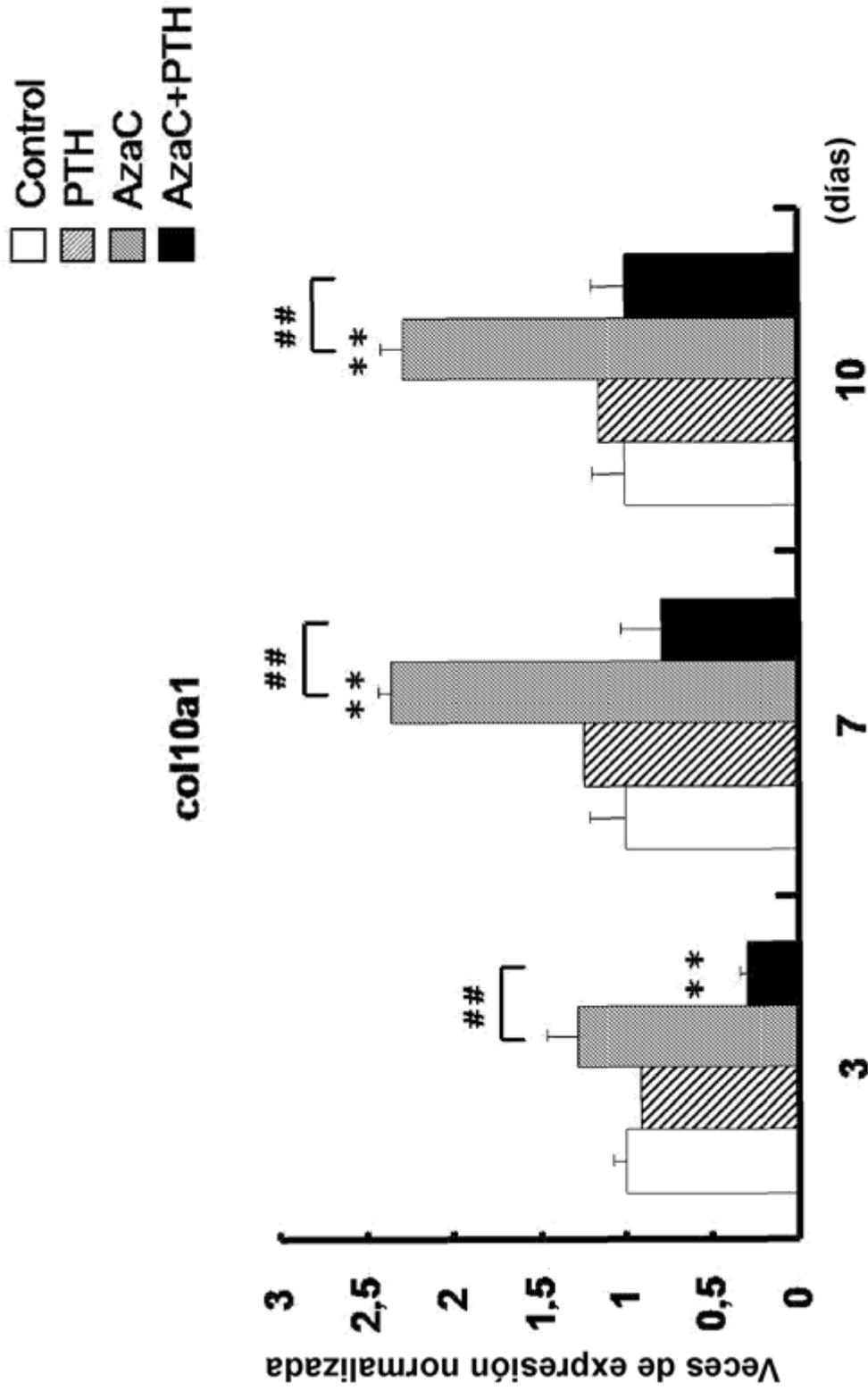


FIG. 1D

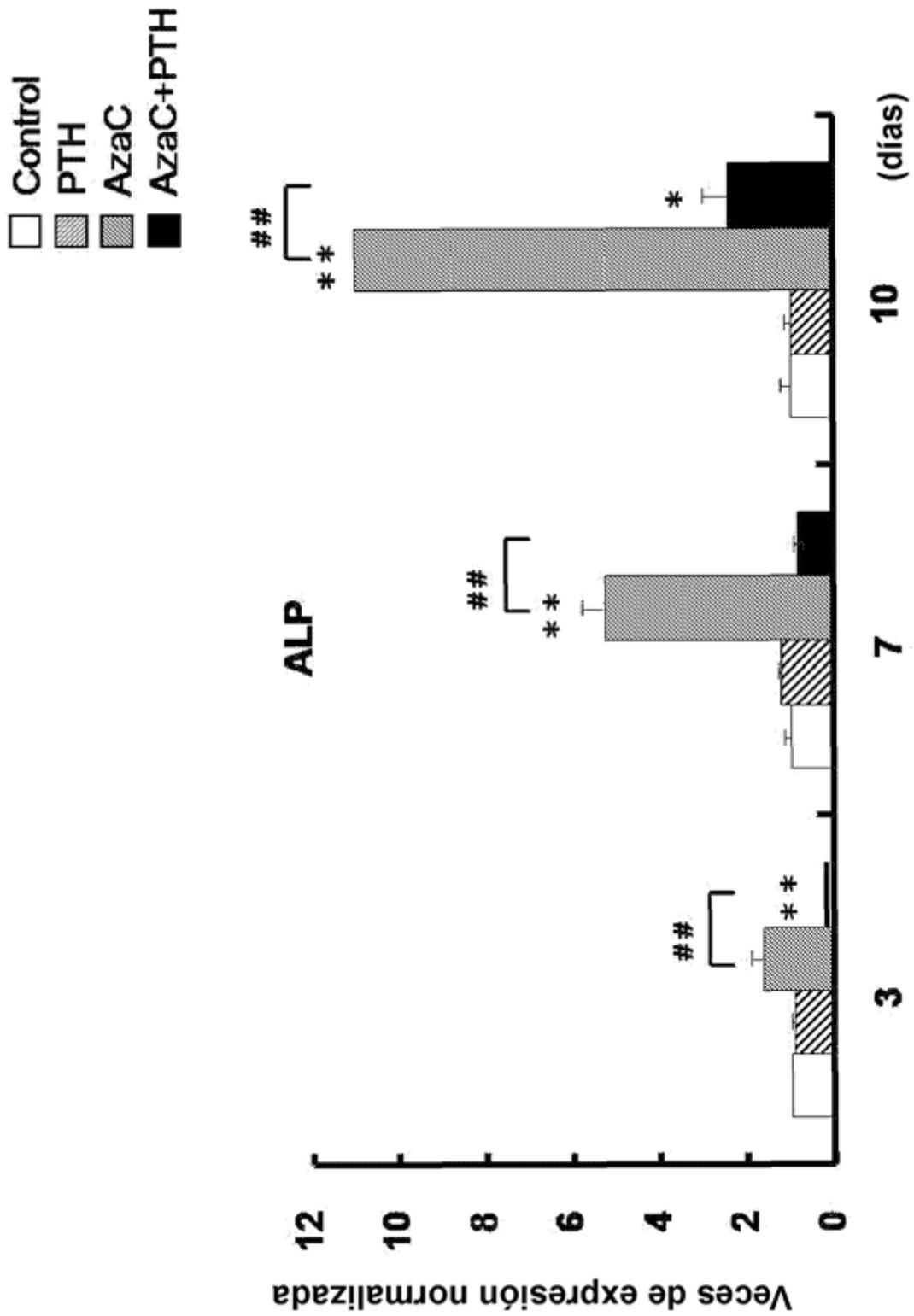


FIG. 1E

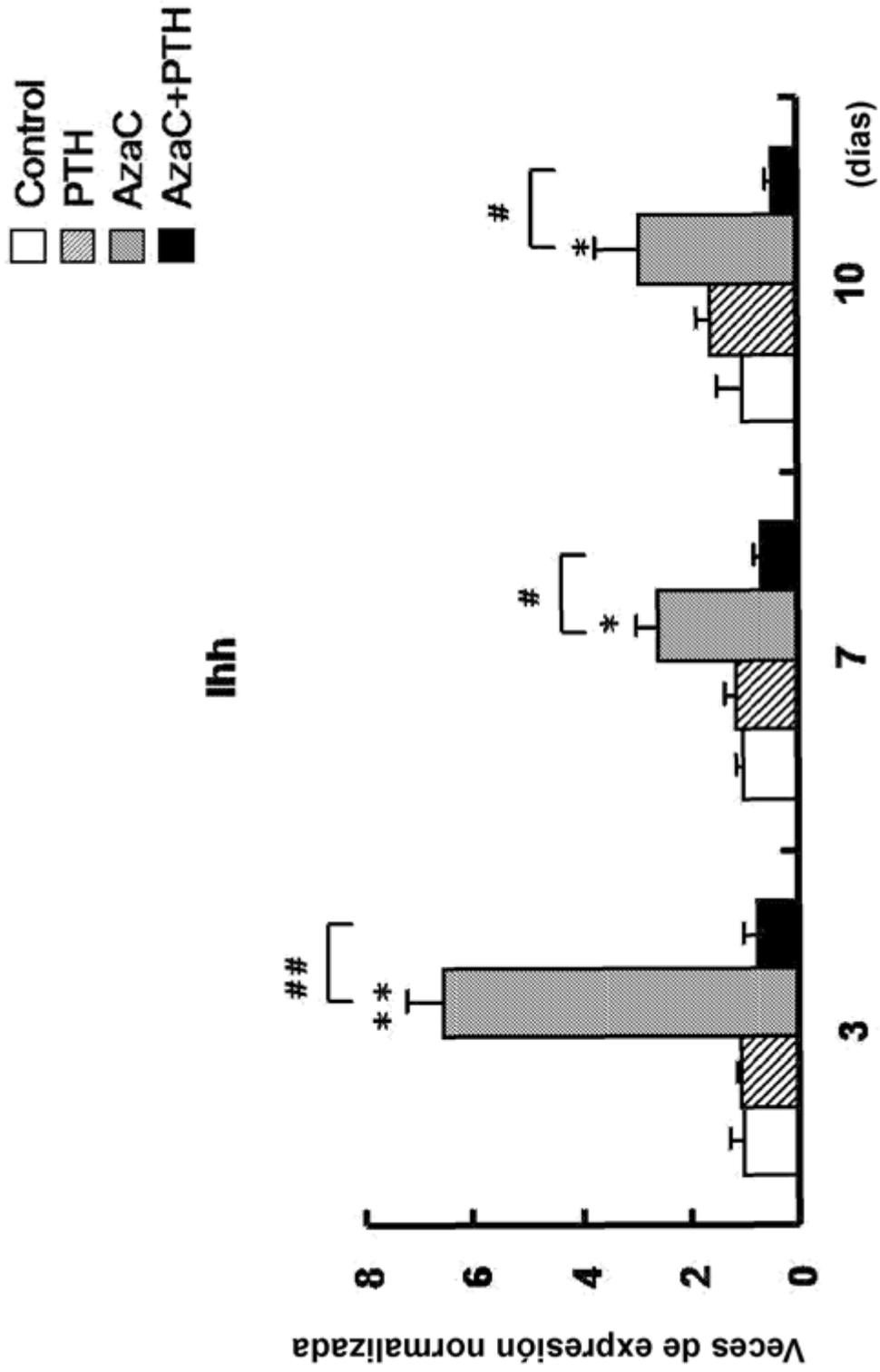


FIG. 1F

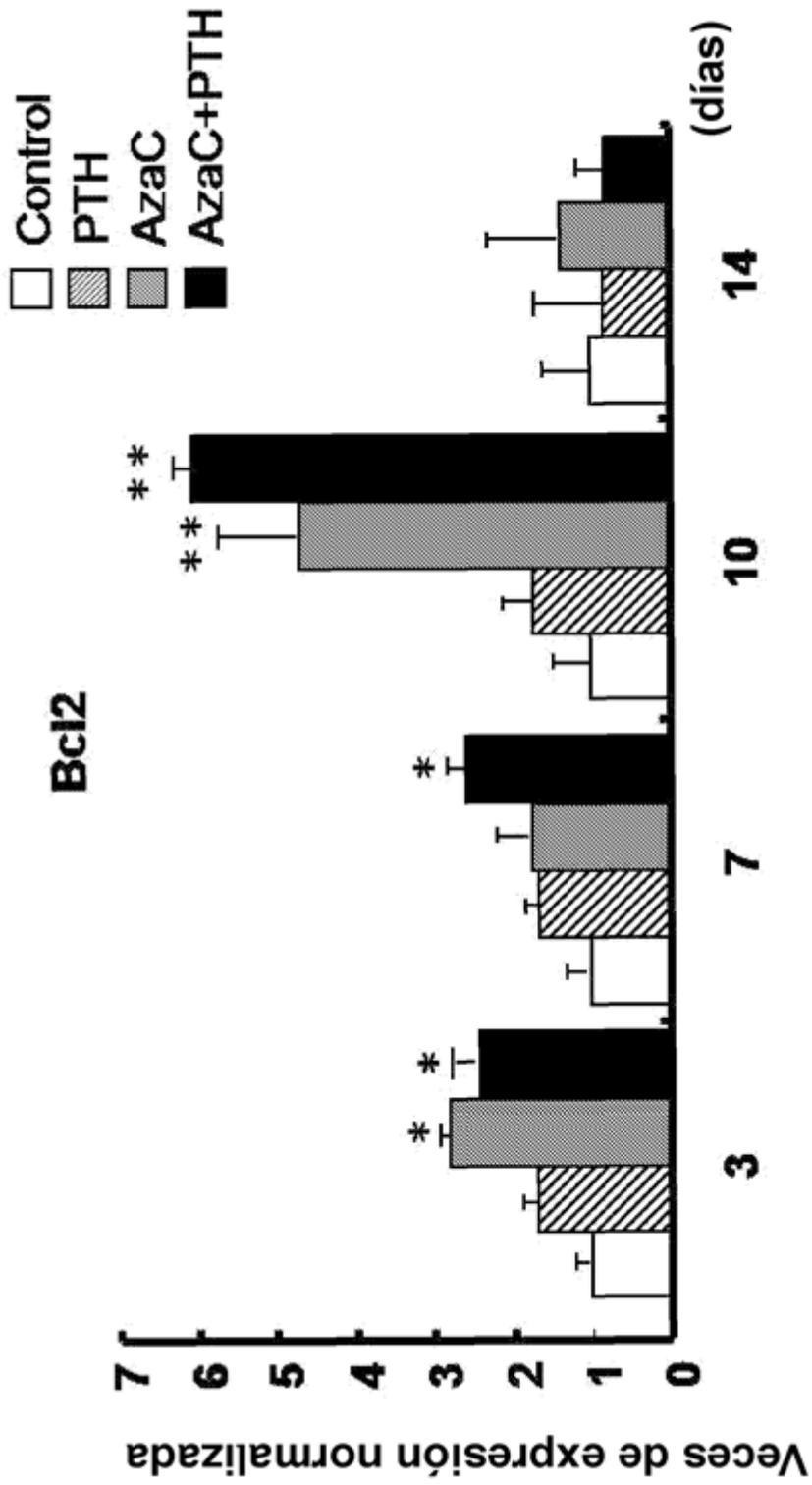


FIG. 2A

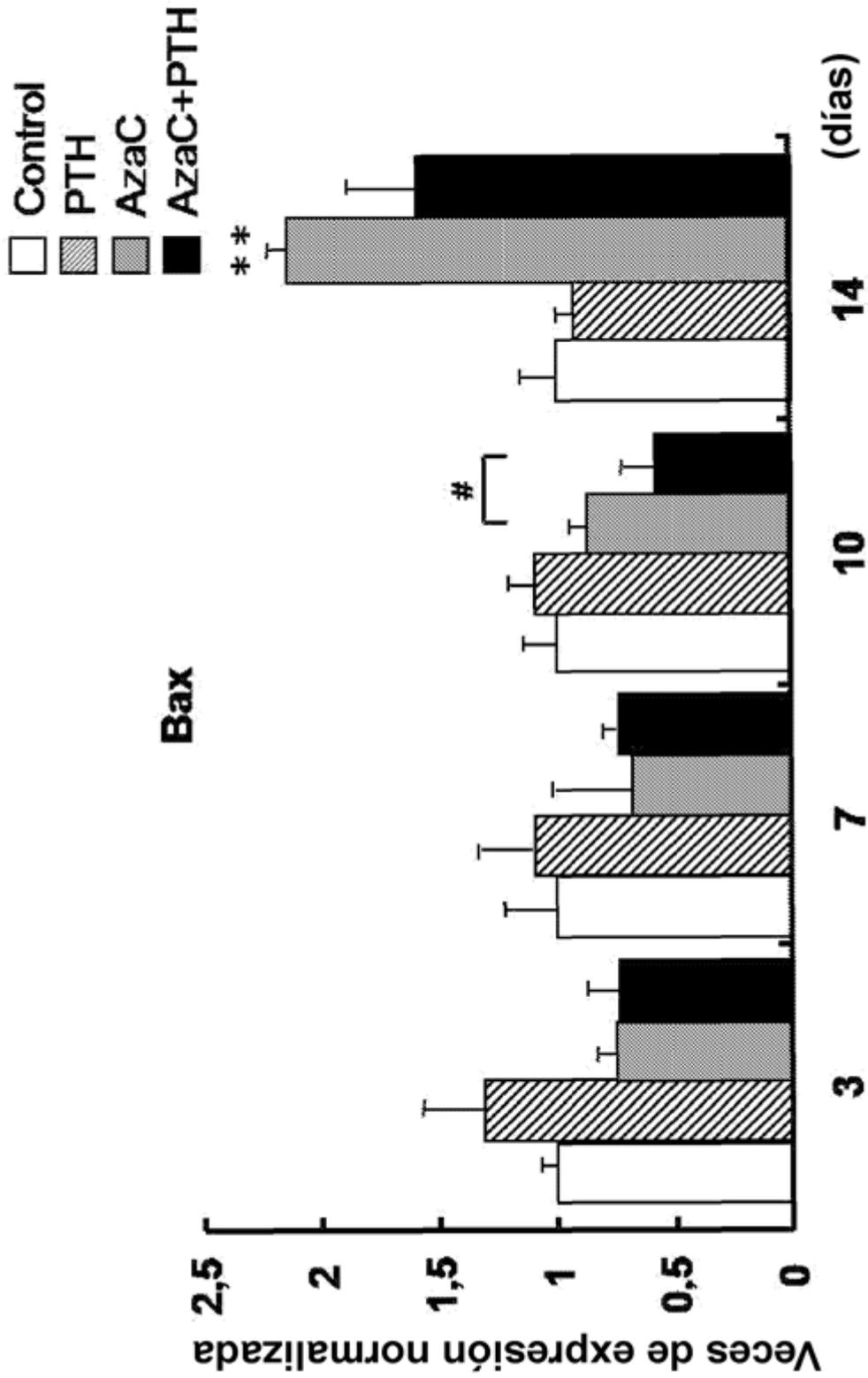


FIG. 2B

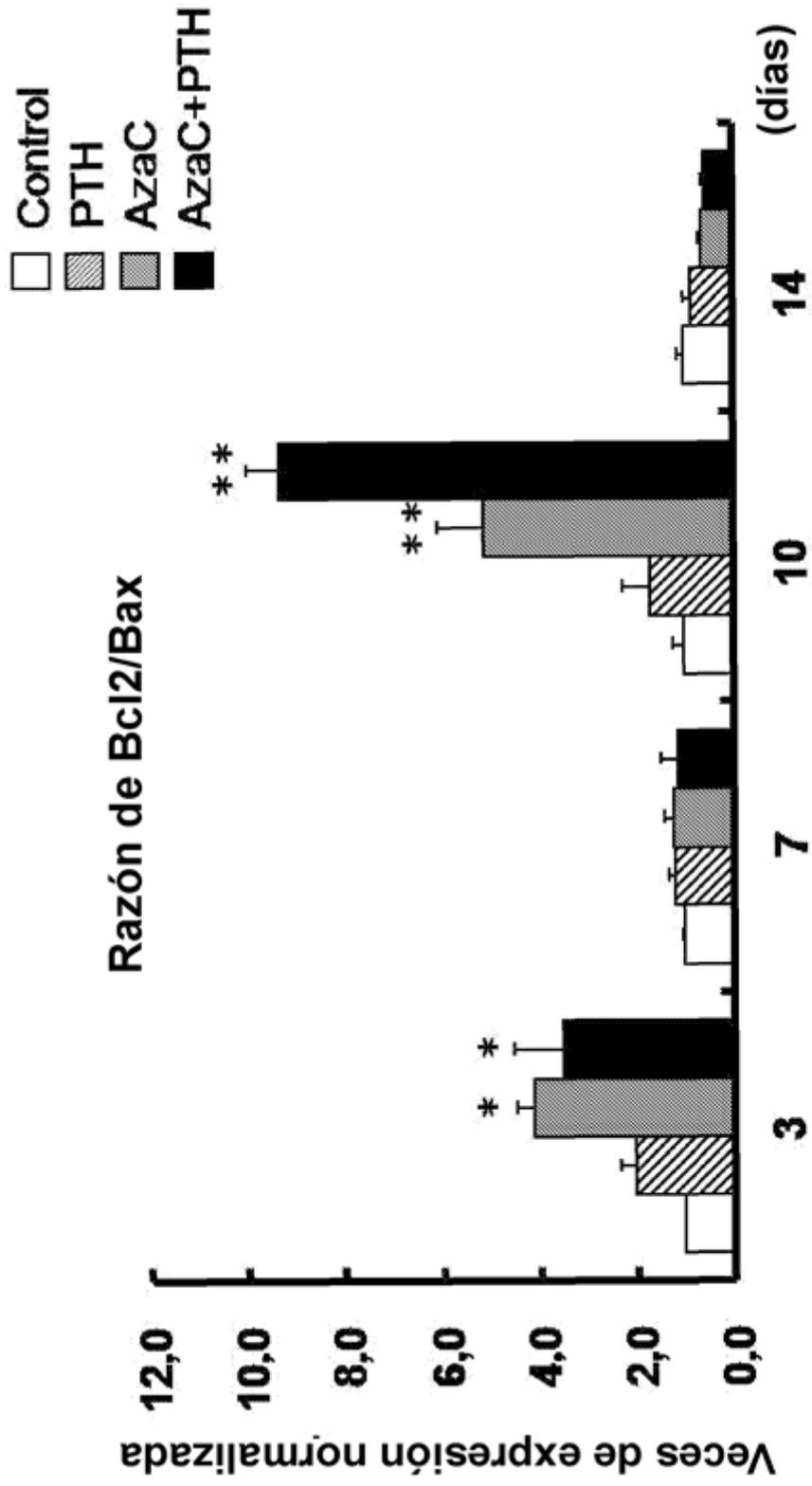


FIG. 2C

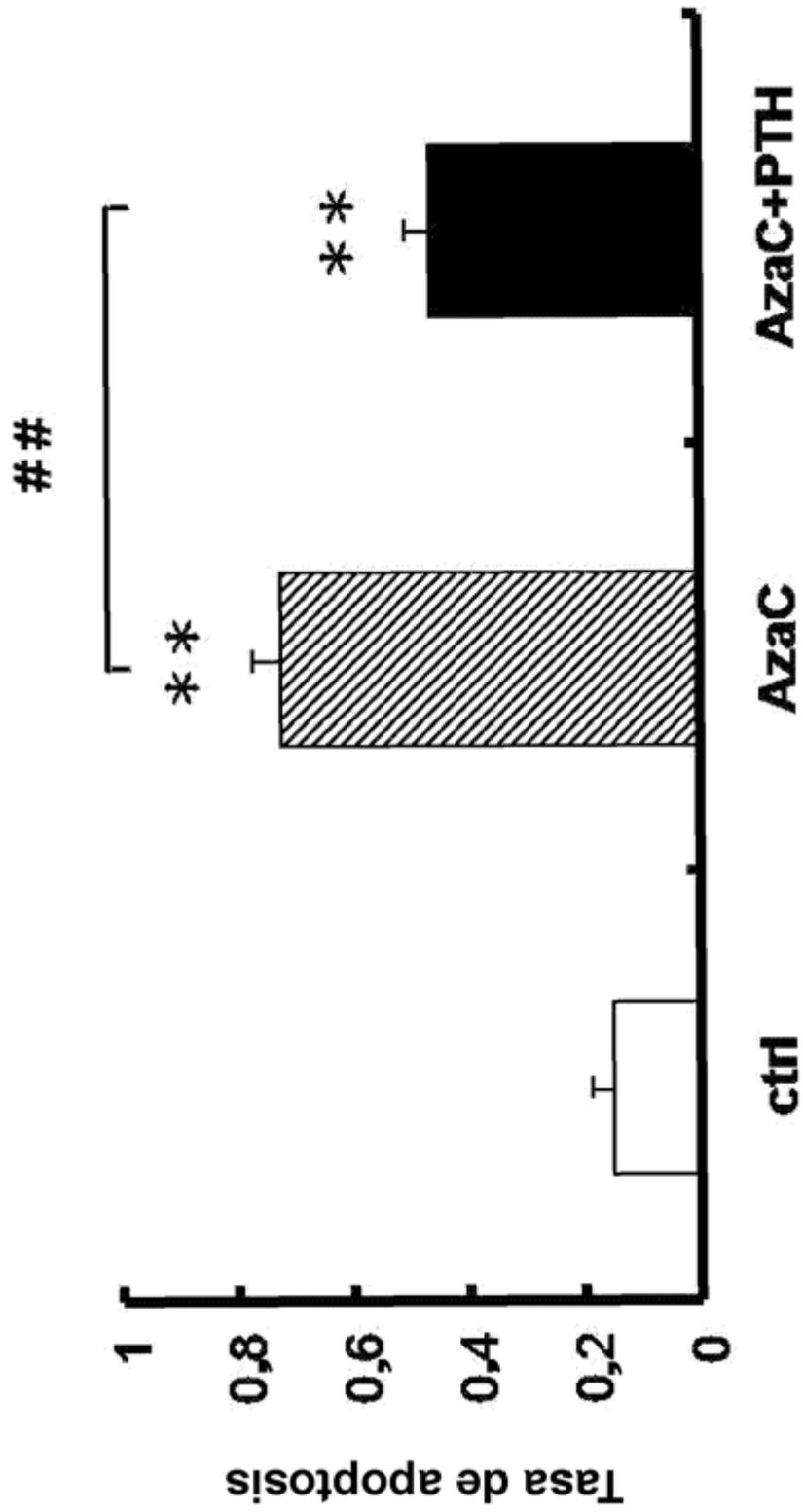


FIG. 3

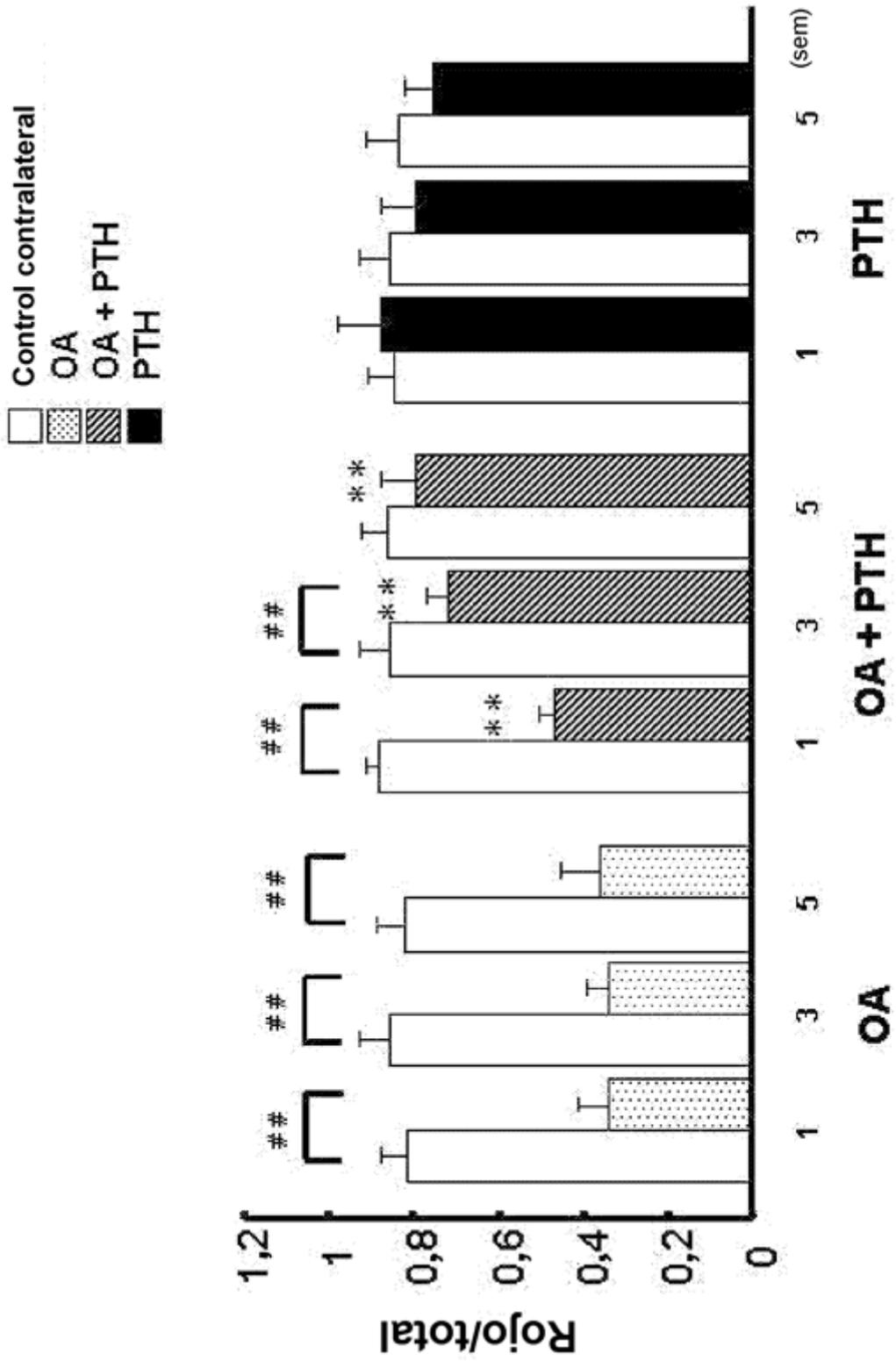


FIG. 4

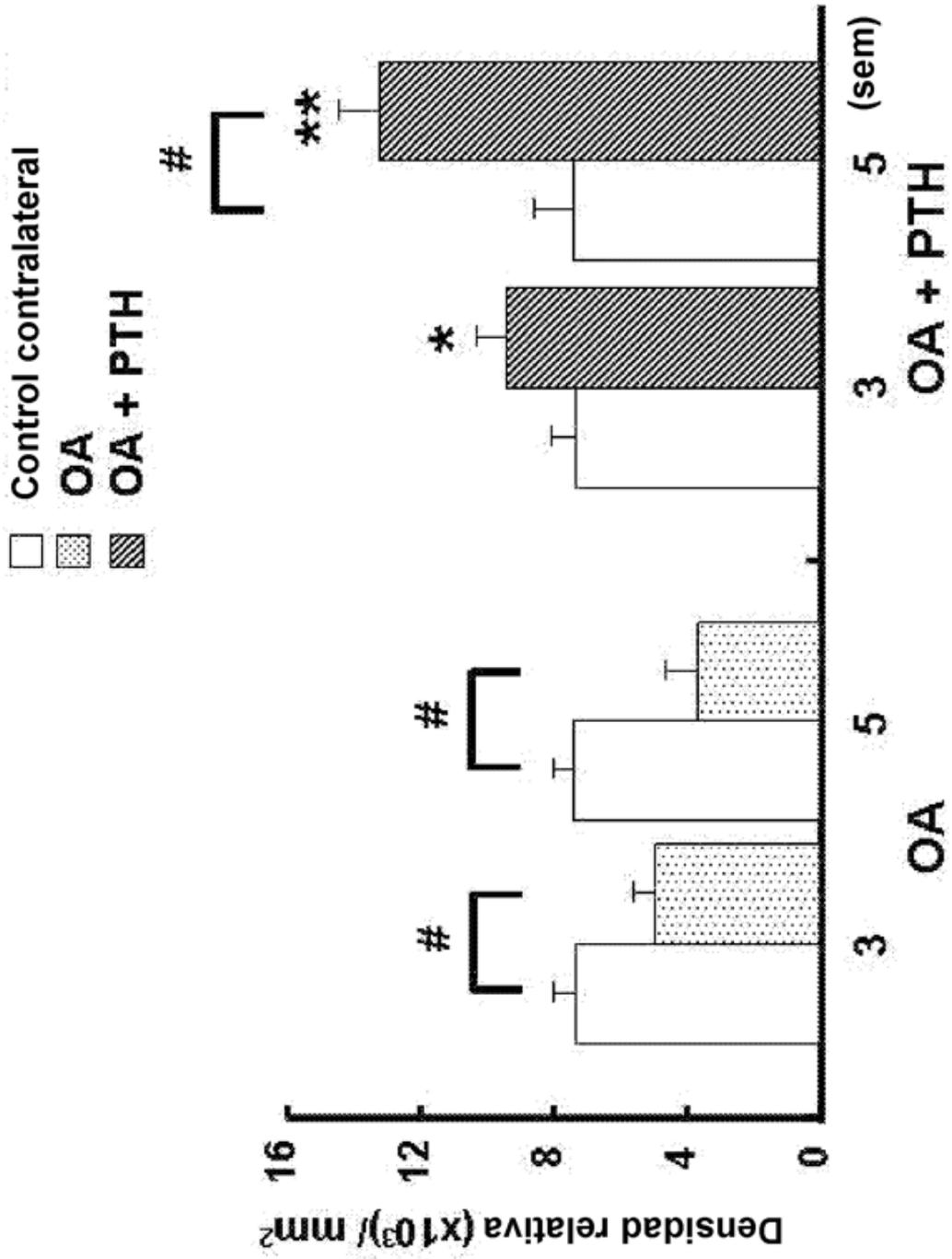


FIG. 5

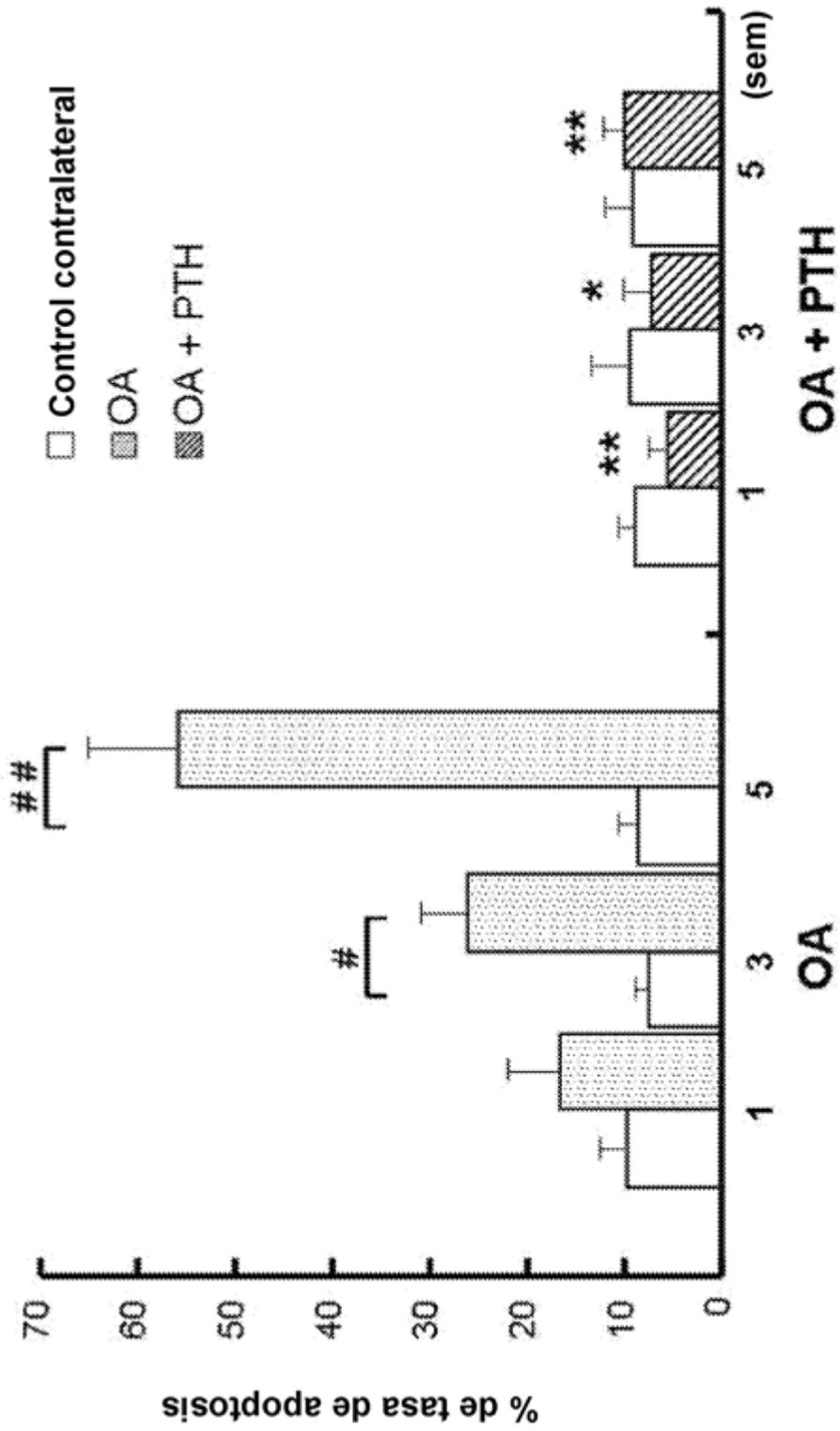


FIG. 6

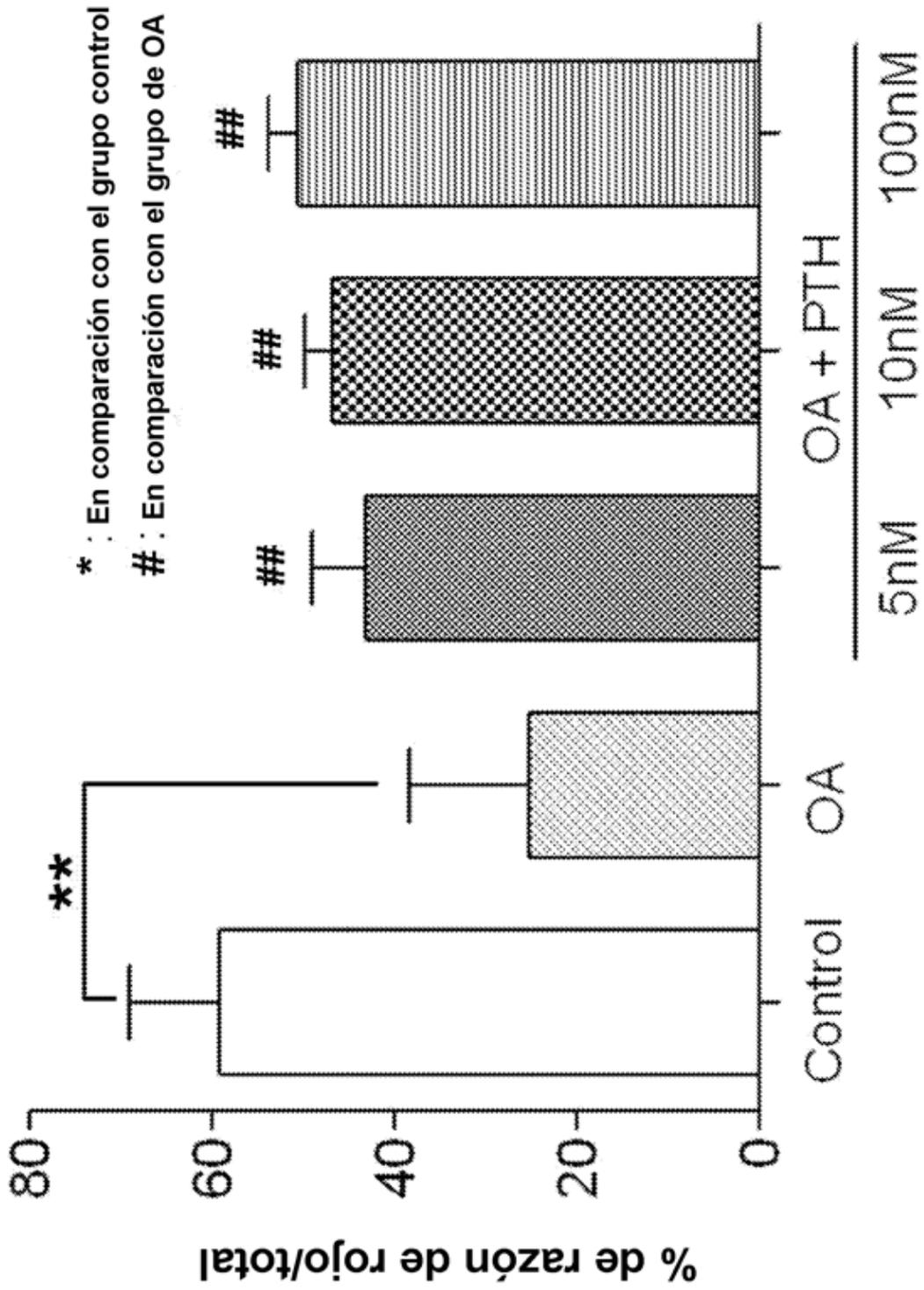


FIG. 7