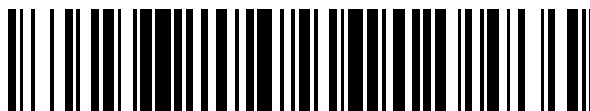


19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 688 551**

51 Int. Cl.:

**A61K 38/18** (2006.01)

**A61P 19/02** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **20.02.2015 PCT/EP2015/053631**

87 Fecha y número de publicación internacional: **27.08.2015 WO15124731**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **20.02.2015 E 15707076 (4)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **11.07.2018 EP 3119417**

54 Título: **Régimen de dosificación del compuesto FGF-18**

30 Prioridad:

**20.02.2014 EP 14000600**

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

**05.11.2018**

73 Titular/es:

**MERCK PATENT GMBH (100.0%)  
Frankfurter Strasse 250  
64293 Darmstadt, DE**

72 Inventor/es:

**LADEL, CHRISTOPH H. y  
GUEHRING, HANS**

74 Agente/Representante:

**ELZABURU, S.L.P**

ES 2 688 551 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

Régimen de dosificación del compuesto FGF-18

**Campo de la invención.**

5 La presente invención se refiere al tratamiento de trastornos de cartílago y cartílago/hueso, la osteoartritis y la lesión del cartílago en particular. Más concretamente, se refiere a un compuesto FGF-18 para uso de acuerdo con regímenes de tratamiento particulares. Específicamente, se refiere a un esquema de tratamiento que comprende administración intra-articular una vez cada dos semanas, por tres o cuatro veces de un compuesto de FGF-18 por ciclo de tratamiento. El régimen de dosificación puede comprender además la administración de un fármaco antiinflamatorio con efectos sobre los síntomas (dolor y función), tal como anakinra o diclofenaco.

10 **Antecedentes de la invención.**

El cartílago está compuesto de condrocitos (células derivadas de células mesenquimales) que se dispersan en la matriz (una sustancia básica firme, parecida a un gel). La matriz cartilaginosa es producida por estas células y comprende principalmente fibras de colágeno tipo II (excepto el fibrocartílago que también contiene fibras de colágeno de tipo I), proteoglicanos y fibras de elastina. El cartílago se encuentra, entre otros sitios, en las articulaciones, la caja torácica, la oreja, la nariz, en la garganta, en la tráquea y en los discos intervertebrales. Existen tres tipos principales de cartílago: hialino, elástico y fibrocartílago, que proporcionan propiedades funcionales notablemente diferentes de acuerdo con su morfología histológica. El cartílago articular, por ejemplo, es un cartílago hialino, que tiene propiedades viscoelásticas y que cubre las superficies articulares de los huesos. El objetivo principal del cartílago articular es proporcionar superficies lisas para asegurar un movimiento sin apenas fricción de los huesos articulados.

20 Los trastornos del cartílago se refieren de un modo amplio a las enfermedades caracterizadas por la degeneración / desintegración del cartílago y las anomalías en los tejidos conjuntivos que se manifiestan por la inflamación, el dolor, la rigidez y la limitación del movimiento de las partes del cuerpo afectadas. Estos trastornos pueden ser debidos a una patología o pueden ser el resultado de un traumatismo o una lesión. El cartílago maduro tiene una capacidad de autorreparación muy limitada, especialmente porque los condrocitos maduros tienen un potencial de proliferación pequeño debido al suministro limitado de nutrientes relacionados con la ausencia de vasos sanguíneos en el cartílago. La sustitución del cartílago dañado, en particular el cartílago articular, causado bien sea por una lesión o bien por una enfermedad, es un importante desafío para los médicos, y los procedimientos de tratamiento quirúrgico disponibles se consideran impredecibles y efectivos tan solo por un tiempo limitado en pacientes más jóvenes sin cambios osteoartrotríticos. Por tanto, la mayoría de los pacientes no buscan tratamiento o bien se les aconseja posponer el tratamiento el mayor tiempo posible. Cuando se requiere tratamiento, el procedimiento estándar depende de la edad y varía entre el reemplazo total o parcial de la articulación, el trasplante de trozos de cartílago o condrocitos, o la técnica de estimulación de la médula ósea (como la microfractura). La microfractura es un procedimiento barato y común que implica la penetración del hueso subcondral para estimular la deposición de cartílago por las células madre derivadas de la médula ósea. Sin embargo, se ha demostrado que esta técnica no repara suficientemente el defecto condral y que el nuevo cartílago formado es principalmente fibrocartílago, lo que da como resultado un tejido de reparación de poca duración. De hecho, el fibrocartílago no tiene las mismas propiedades biomecánicas que el cartílago articular hialino y a menudo carece de integración lateral apropiada en el cartílago circundante. Por esta razón, el fibrocartílago recién sintetizado puede descomponerse más fácilmente (marco de tiempo esperado: 5 - 10 años).

40 Para los pacientes con osteoartritis (OA), fallan todas estas técnicas de reparación del cartílago. El tratamiento no quirúrgico restante consiste principalmente en terapia física, modificación del estilo de vida (por ejemplo, reducción del peso corporal), dispositivos de soporte, fármacos orales (por ejemplo, fármacos antiinflamatorios no esteroideos), inyección de fármacos (por ejemplo, ácido hialurónico y corticoides) y suplementación alimenticia. Todos estos tratamientos son incapaces de detener la progresión de la enfermedad de OA. Si la terapia del dolor también falla, la cirugía, como el reemplazo articular o la osteotomía tibial alta para la articulación de la rodilla, es la opción que queda para los pacientes. Las osteotomías tibiales o femorales (cortar el hueso para reequilibrar el desgaste de la articulación) pueden reducir los síntomas, ayudar a mantener un estilo de vida activo y retrasar la necesidad de un reemplazo total de la articulación. El reemplazo total de la articulación puede proporcionar alivio para el síntoma de la osteoartritis avanzada, pero generalmente requiere un cambio significativo en el estilo de vida y/o el nivel de actividad de un paciente.

Los tratamientos farmacológicos disponibles actualmente se dirigen principalmente al alivio del dolor. En este momento no existe un tratamiento disponible comercialmente que restablezca los daños en el cartílago (véase Lotz, 2010).

55 La Interleucina-1 alfa (IL-1 $\alpha$ ) y la interleucina-1 beta (IL-1 $\beta$ ) son agonistas naturales del receptor de IL-1 de tipo I (IL-1RA). Se ha demostrado que la sobreexpresión de citocinas proinflamatorias, tales como la IL-1, desempeña un papel importante en la patogénesis de enfermedades inmunoinflamatorias como la artritis reumatoide (RA) (Bingham, 2002) o la osteoartritis (OA) (Lee et al., 2013). La aplicación clínica de IL-1 $\alpha$  e IL-1 $\beta$  antagonica en la RA ha sido investigada con anakinra (Kineret™), una forma no glucosilada de IL-1ra humana. El uso de esta proteína terapéutica ha llevado a una reducción en la frecuencia y severidad del daño articular en pacientes con AR (Bresnihan, 2002; St. Clair, 2002),

así como también en la reducción del dolor (Mertens et al., 2009). Esta molécula ha sido aprobada en 2001 en el tratamiento de algunos tipos de RA. Aunque la IL-1 está implicada también en OA, la terapia con anakinra no se asocia significativamente con mejoras en los síntomas de OA en comparación con el placebo, si bien se observó una tendencia a la reducción del dolor con anakinra 150 mg frente al placebo (Chevalier et al., 2009).

5 El factor de crecimiento de fibroblastos 18 (FGF-18) es un miembro de la familia de proteínas del Factor de Crecimiento de Fibroblastos (FGF), estrechamente relacionado con FGF-8 y FGF-17. Se ha demostrado que FGF-18 es un agente proliferativo para condrocitos y osteoblastos (Ellsworth et al., 2002, Shimoaka et al., 2002). El FGF-18 ha sido propuesto para el tratamiento de trastornos del cartílago, tales como la osteoartritis y la lesión del cartílago, ya sea solo (documento WO2008/023063) o en combinación con ácido hialurónico (documento WO2004/032849).

10 Se han sugerido varios regímenes de dosificación para el FGF18. Por ejemplo, Moore et al. (2005) describieron la administración dos veces por semana durante 3 semanas, y el documento WO2008/023063 enseñó la administración una vez por semana durante 3 semanas. Este último régimen de dosificación ha sido investigado en ensayos clínicos (para más detalles, véanse por ejemplo los documentos NCT01033994, NCT00911469 y NCT01066871).

15 Aunque el régimen de dosificación descrito en el documento WO2008023063 da buenos resultados en la reparación del cartílago articular, todavía existe un riesgo de sinovitis aguda. Por esta razón, existe la necesidad de un método para disminuir el riesgo de sinovitis aguda relacionada con el tratamiento así como aumentar la tolerancia del paciente a la inyección intrarticular, mientras se mantiene la eficacia para el tratamiento del trastorno del cartílago, principalmente por la proliferación de condrocitos y la posterior reparación del cartílago. Tal método debería no solo permitir la reparación del cartílago articular, posiblemente en ausencia de sinovitis, sino también permitir la regeneración del nuevo cartílago que tiene buenas propiedades (es decir, principalmente cartílago hialino). Realmente, la generación de dicho cartílago hialino es valiosa tanto como componente terapéutico como para matrices biológicas (Getgood et al., 2010). También existe la necesidad de un método para la disminución del dolor / mejora de función, manteniendo al mismo tiempo la eficacia para el tratamiento del trastorno del cartílago. De hecho, el dolor no solo se asocia muy a menudo con los trastornos del cartílago, sino que representa el síntoma principal para la detección clínica de estos trastornos.

#### Resumen de la invención.

Se describe en el presente texto un método para tratar a un paciente con un trastorno del cartílago que comprende la administración de un compuesto FGF-18 en donde el compuesto FGF-18 se administra intraarticularmente al menos tres veces por ciclo de tratamiento, estando separadas dichas administraciones por 2 semanas (administraciones bisemanales). En una realización preferida, dichas administraciones están separadas por intervalos regulares de aproximadamente 2 semanas cada una. Preferiblemente, el compuesto FGF-18 se administra en intervalos bisemanales regulares.

La presente invención proporciona además un compuesto FGF-18 para uso en el tratamiento de un paciente que tiene un trastorno de cartílago en donde el compuesto FGF-18 debe administrarse al menos dos veces por ciclo de tratamiento, estando separadas dichas administraciones por aproximadamente 2 semanas, preferiblemente por aproximadamente un mes (administraciones mensuales). En una realización preferida, dichas administraciones están separadas por intervalos regulares de aproximadamente 2 semanas cada una. Preferiblemente, el compuesto FGF-18 se administra en intervalos bisemanales regulares.

Preferiblemente, el compuesto de FGF-18 que se ha de administrar es el fragmento de FGF-18 designado en este documento como trFGF-18 (o esprifermina) y el ciclo de posología es de 3 a 300 µg por inyección intraarticular, una vez cada 2 semanas durante 3 administraciones consecutivas (un ciclo de tratamiento).

En el contexto de la presente invención en su conjunto, cualquier tratamiento (o cualquier método de tratamiento) con un compuesto FGF-18 puede comprender además la administración de un medicamento antiinflamatorio con efectos sobre los síntomas (dolor y función), tales como anakinra o diclofenaco. Preferiblemente, dicha administración se realiza al mismo tiempo que la administración del compuesto FGF-18. Si se necesita un fármaco antiinflamatorio, se seguiría que dicho fármaco antiinflamatorio debe administrarse de forma concomitante con el compuesto FGF-18 al menos tres veces por ciclo de tratamiento, estando dichas administraciones separadas por aproximadamente 2 semanas, preferiblemente por 2 semanas (administraciones bi-semanales). Preferiblemente, el fármaco antiinflamatorio es anakinra o diclofenaco y el ciclo de posología es de 0,01 a 500 mg por administración, una vez cada 2 semanas durante 3 administraciones consecutivas (un ciclo de tratamiento).

En una realización preferida, tal ciclo de tratamiento (es decir, compuesto FGF-18 solo o en combinación con un fármaco antiinflamatorio con efectos sobre los síntomas (dolor y función)) puede repetirse varios meses después de la última inyección del ciclo de tratamiento precedente, por ejemplo después de 2, 4 o 6 meses o incluso después de 1 año.

55 En realizaciones de la invención preferidas, el trastorno del cartílago a tratar es artritis, como la osteoartritis, o lesión del cartílago con o sin intervención quirúrgica, como la microfractura. Sorprendentemente se ha encontrado que los métodos y usos de la presente invención mejoran notablemente la reparación del cartílago y estimulan la proliferación de condrocitos, y entre tanto aumentan la tolerancia del paciente a la inyección intrarticular. Sorprendentemente, se

ha encontrado también que cuando se usa anakinra o diclofenaco junto con FGF18, es capaz de restaurar eficientemente la actividad proliferativa del compuesto FGF-18. Otra ventaja de la presente invención es que la sinovitis se reducirá en comparación con lo que se observa con otros regímenes.

#### Definiciones.

5 - El término "compuesto FGF-18" o "FGF-18", como se usa en el presente documento, pretende ser una proteína que mantiene al menos una actividad biológica de la proteína FGF-18 humana. El FGF-18 puede ser nativo, en su forma madura, una forma recombinante o una forma truncada de la misma. Las actividades biológicas de la proteína FGF-18 humana incluyen notablemente el aumento de la proliferación de condrocitos u osteoblastos (véase el documento WO98/16644) o de la formación de cartílago (véase el documento  
10 WO2008/023063). El FGF-18 humano nativo o silvestre es una proteína expresada por condrocitos del cartílago articular. El FGF-18 humano se designó primero como zFGF-5 y se describe completamente en el documento WO98/16644. La SEQ ID NO: 1 corresponde a la secuencia de aminoácidos del FGF-18 humano nativo, con un péptido señal que consiste en los restos de los aminoácidos 1 (Met) a 27 (Ala). La forma madura del FGF-18 humano corresponde a la secuencia de aminoácidos desde el resto 28 (Glu) al resto 207 (Ala) de la SEQ ID NO: 1 (180 aminoácidos).

El FGF-18, en la presente invención, puede producirse mediante un método recombinante, tal como se enseña en la solicitud WO2006/063362. Dependiendo de los sistemas de expresión y de las condiciones, el FGF-18 en la presente invención se expresa en una célula hospedadora recombinante con un resto de metionina (Met) de partida o con una secuencia señal para la secreción. Cuando se expresa en un  
20 hospedador procarionta, tal como en E. coli, FGF-18 contiene un resto de Met adicional en el extremo N-terminal de su secuencia. Por ejemplo, la secuencia de aminoácidos del FGF-18 humano, cuando se expresa en E. coli, comienza con un resto Met en el término N (posición 1) seguido de los restos 28 (Glu) hasta el resto 207 (Ala) de la SEQ ID NO: 1.

- El término "forma truncada" de FGF18, como se usa en el presente documento, se refiere a una proteína que comprende o consiste en los restos 28 (Glu) a 196 (Lys) de SEQ ID NO: 1. Preferiblemente, la forma truncada de la proteína FGF-18 es el polipéptido designado "trFGF-18" (170 aminoácidos, también conocido como rhFGF1 8 o esprifermina), que comienza con un resto Met (en N-terminal) seguido de restos de los aminoácidos 28 (Glu) - 196 ( Lys) del FGF-18 humano de tipo silvestre. La secuencia de aminoácidos de trFGF-18 se muestra en SEQ ID NO: 2 (los restos de aminoácidos 2 a 170 de SEQ ID NO: 2 corresponden a los restos de aminoácidos 28 a 196 de SEQ ID NO: 1). trFGF-18 es una forma truncada recombinante de FGF-18 humano, producida en E. coli (véase el documento WO2006/063362). Se ha demostrado que trFGF-18 muestra actividades similares a las del FGF-18 humano maduro, por ejemplo, aumenta la proliferación de condrocitos y la deposición de cartílago que conduce a la reparación y reconstrucción para una variedad de tejidos cartilaginosos (véase el documento WO2008/023063) .

35 - Las expresiones "fármaco antiinflamatorio con efectos sobre los síntomas (dolor y función)" o "fármaco antiinflamatorio" como se usan en este documento se refieren a un fármaco antiinflamatorio que tiene efectos sobre los síntomas que están relacionados con los trastornos del cartílago que deben tratarse, como el dolor y la función. Los "fármacos antiinflamatorios" preferidos para usar de acuerdo con esta invención son anakinra y diclofenaco. La anakinra es una forma recombinante no glicosilada de antagonista del receptor de la interleucina 1 humano (IL-1Ra). Se comercializa bajo el nombre Kineret®. Su secuencia corresponde a SEQ ID NO: 3. El diclofenac (es decir, el ácido 2-(2,6-diclororanilino) fenilacético) es un fármaco bien conocido para reducir la inflamación y como analgésico que reduce el dolor en ciertas afecciones. Se comercializa bajo varios nombres comerciales.

45 - El término "aproximadamente", en "aproximadamente de 2semanas" o en "aproximadamente cada 2 semanas", abarca administraciones separadas por 2 semanas a 5 semanas (14 días), así como la administración separada por 2 semanas  $\pm$  unos pocos días (p. ej.  $\pm$  1, 2, 3 días). En realidad, debe entenderse que, especialmente desde un punto de vista práctico, la administración del compuesto FGF-18, por ejemplo trFGF-18, no siempre puede realizarse a intervalos exactos, p. ej. exactamente 2 semanas (14 días) día por día después de la administración anterior. Por consiguiente, en el contexto de la invención, 2 semanas significa 14 días, pero también puede ser 11, 12, 13, 15, 16 o 17 días después de la administración anterior, para comodidad del paciente. En el contexto de la presente invención, el término "2 semanas" es similar a los términos "cada dos semanas", "cada otra semana" o "bi-semanalmente" y pueden usarse indistintamente (Figura 1). "2 semanas" puede usarse si se hace referencia a "días" (p. ej. 1ª inyección un lunes, siguiente inyección un lunes 2 semanas después), o si uno se refiere a una "fecha" (por ejemplo, 1ª inyección el 1 de agosto; siguiente inyección el 15 de agosto).

60 - La expresión "ciclo de tratamiento" o "ciclo" corresponde al período en el que se administra un compuesto FGF-18 cada 2 semanas (administraciones consecutivas). Como ejemplo, un ciclo de tratamiento puede consistir en 3 inyecciones en intervalos de 2 semanas cada una. Tal "ciclo de tratamiento" puede repetirse. Por ejemplo, puede realizarse un segundo "ciclo de tratamiento" 2, 3, 4, 5 o 6 meses después de la última inyección del ciclo anterior. Alternativamente, también se puede realizar un segundo ciclo 1 año o 2 años

después de la primera inyección en el primer ciclo. Como ejemplo, se puede seguir un primer ciclo de tratamiento que consiste en 3 inyecciones en intervalos de 2 semanas cada uno, 3 meses después de la última inyección de dicho ciclo, mediante un segundo ciclo de tratamiento de 3 inyecciones a intervalos de 2 semanas cada uno.

- 5 - El término "trastorno del cartílago", como se usa en este documento, abarca trastornos resultantes de daños debidos a una lesión, tales como una lesión traumática, condropatía o artritis. Los ejemplos de trastornos del cartílago que pueden tratarse mediante la administración de la formulación de FGF-18 descrita en este documento incluyen, pero no se limitan a ellos, la artritis, tal como la osteoartritis y la lesión del cartílago. Las enfermedades y trastornos degenerativos del cartílago o de la articulación, como la condrocalcinosis, la policondritis, la policondritis recidivante, la espondilitis anquilosante o la costocondritis, también se incluyen en esta lista de términos. La International Cartilage Repair Society (Sociedad Internacional de Reparación del Cartílago) ha propuesto un sistema de clasificación artroscópica para evaluar la gravedad del defecto del cartílago: grado 0: cartílago sano (normal), grado 1: el cartílago tiene una mancha suave o ampollas, grado 2: desgarros menores visibles en el cartílago, grado 3: las lesiones tienen grietas profundas (más del 50% de la capa de cartílago) y grado 4: el desgarramiento del cartílago deja expuesto el hueso subyacente (subcromal) (véase la publicación de ICRS: [http://www.cartilage.org\\_files/contentmanagement/ICRS\\_evaluation.pdf](http://www.cartilage.org_files/contentmanagement/ICRS_evaluation.pdf), página 13).
- 10
- 15
- El término "artritis" como se usa en el presente documento abarca trastornos tales como osteoartritis, artritis reumatoide, artritis reumatoide juvenil, artritis infecciosa, artritis psoriásica, enfermedad de Still (aparición de artritis reumatoide juvenil) u osteocondritis disecante. Preferiblemente incluye enfermedades o trastornos en los que el cartílago está dañado.
- 20
- El término "osteoartritis", o "OA", se usa para designar la forma más común de artritis. El término "osteoartritis" abarca tanto la osteoartritis primaria como la osteoartritis secundaria (véase, por ejemplo, The Merck Manual, 17ª edición, página 449). La osteoartritis puede ser causada por la descomposición del cartílago. Los trozos de cartílago pueden desgajarse y causar dolor e hinchazón en la articulación entre los huesos. Con el tiempo, el cartílago puede desgastarse por completo y los huesos se frotan entre sí. La osteoartritis puede afectar a cualquier articulación, pero generalmente afecta a las manos, los hombros y las articulaciones que soportan peso, como las caderas, las rodillas, los pies y la columna vertebral. En un ejemplo preferido, la osteoartritis puede ser osteoartritis de rodilla u osteoartritis de cadera. Esta lista de términos abarca en particular las formas de osteoartritis que se clasifican como estadio 1 a estadio 4 o grado 1 a grado 6 de acuerdo con el sistema de clasificación de la OARSI. El experto en la técnica conoce plenamente las clasificaciones de la osteoartritis que se utilizan en la técnica, en particular dicho sistema de evaluación de la OARSI (también llamado OCHAS, véase, por ejemplo, Custers et al., 2007). La osteoartritis es uno de los trastornos del cartílago preferidos que pueden tratarse administrando los compuestos FGF-18 de acuerdo con la presente invención.
- 25
- 30
- 35
- El término "lesión del cartílago" tal como se usa en el presente documento es un trastorno del cartílago o daño del cartílago que resulta notablemente de un trauma. Las lesiones del cartílago pueden ocurrir notablemente después de la destrucción mecánica traumática, especialmente después de un accidente o una cirugía (por ejemplo, cirugía de microfractura). Este término "lesión del cartílago" también incluye fractura condral u osteocondral y daño en el menisco. También se consideran dentro de esta definición las lesiones o el desgaste, relacionados con el deporte, de los tejidos de la articulación. El término también incluye microdaño o traumatismo contundente, una fractura condral, una fractura osteocondral o daño al menisco.
- 40
- En el contexto de la presente invención, la "eficacia" de un tratamiento puede medirse basándose en los cambios en el grosor del cartílago, por ejemplo, el grosor del cartílago articular de la articulación. Este grosor puede evaluarse, por ejemplo, mediante tomografía computerizada de rayos X, imágenes de resonancia magnética (IRM) o mediciones ultrasónicas.
- 45

#### Descripción detallada de la invención.

En el presente texto se describen esquemas de administración para el tratamiento de diversos trastornos del cartílago, tales como la osteoartritis y la lesión del cartílago, con un compuesto FGF-18. Preferiblemente, dicho compuesto FGF-18 es trFGF-18, como se definió anteriormente. En el contexto de la presente invención, se ha demostrado que los compuestos FGF-18 tienen efectos óptimos que mejoran la enfermedad o los síntomas sobre los trastornos del cartílago cuando se administran de acuerdo con los métodos y usos descritos en el presente documento. Sorprendentemente se ha encontrado que los regímenes de dosificación de la presente invención (es decir, programas de dosificación de frecuencia inferior a una vez a la semana durante tres semanas por ciclo de tratamiento) causan un estado de inflamación reducida (por ejemplo, sinovitis aguda) durante la siguiente inyección y por tanto puede observarse la actividad completa de los compuestos FGF-18. Este descubrimiento no se esperaba debido a la vida mitad más bien corta de FGF-18 en la articulación (menos de 24 horas).

50

55

En el contexto de la presente invención en su conjunto, cualquier tratamiento (o cualquier método de tratamiento) con un compuesto FGF-18 puede comprender además la administración de un fármaco antiinflamatorio con efectos sobre

los síntomas (dolor y función), tales como anakinra o diclofenaco. Preferiblemente, tal administración (o coadministración) se realiza al mismo tiempo que la administración del compuesto FGF-18 (es decir, de forma concomitante con ella).

5 En una realización, la presente invención proporciona un método para tratar a un paciente que tiene un trastorno de cartílago, que comprende la administración de un compuesto FGF-18, en el que el compuesto FGF-18 se administra intraarticularmente al menos tres veces por ciclo de tratamiento, estando dichas administraciones separadas por aproximadamente 2 semanas, preferiblemente por 2 semanas (es decir, cada 2 semanas, cada otra semana o bi-semanalmente). El compuesto FGF-18 preferido es trFGF-18. En una realización preferida, el compuesto FGF-18 puede administrarse 3 veces por ciclo de tratamiento, en intervalos regulares de 2 semanas o de aproximadamente 2  
10 semanas (es decir, 3 veces por ciclo de tratamiento, en intervalos regulares de 2 semanas o una vez cada 2 semanas). Tal tratamiento puede comprender 1, 2 o 3 ciclos de tratamiento por año. Se puede administrar un medicamento antiinflamatorio, como anakinra o diclofenaco, al mismo tiempo que el compuesto FGF-18.

15 En otro aspecto de la presente invención, se proporciona un compuesto FGF-18 para ser usado en el tratamiento de un paciente que tiene un trastorno de cartílago, en donde el compuesto FGF-18 se administra intraarticularmente al menos tres veces por ciclo de tratamiento, estando separadas dichas administraciones por aproximadamente 2 semanas, preferiblemente por 2 semanas. El compuesto FGF-18 preferido es trFGF-18. En una realización preferida, el compuesto FGF-18 se administra 3 veces por ciclo de tratamiento, en intervalos regulares de 2 semanas o de aproximadamente 2 semanas (es decir, 3 veces por ciclo de tratamiento, en intervalos regulares de 2 semanas o una vez cada 2 semanas).

20 Tal tratamiento puede comprender 1, 2 o 3 ciclos de tratamiento por año. Puede administrarse un fármaco antiinflamatorio con efectos sobre los síntomas (dolor y función), tal como anakinra o diclofenaco, al mismo tiempo que el compuesto FGF-18.

De acuerdo con la presente invención, la administración del compuesto FGF-18, bien sea solo o en combinación con un fármaco antiinflamatorio, como anakinra o diclofenac, se ha de realizar a intervalos regulares, sin embargo se autorizan ligeras variaciones de +/- unos pocos días (preferiblemente no más de 3). Por ejemplo, cuando las administraciones están separadas por aproximadamente 2 semanas, si la primera administración de un ciclo se da un  
25 martes, la segunda administración puede realizarse el martes, 2 semanas después de la primera administración (intervalo regular) o unos pocos días después o antes (por ejemplo, el lunes anterior o el jueves siguiente). De forma similar, si la primera administración se da por ejemplo el 1 de agosto (por ejemplo un lunes), la segunda administración puede hacerse el 15 de agosto (lunes), es decir, 2 semanas después de la primera administración (intervalo regular) o unos pocos días después o antes (por ejemplo, el viernes o el sábado) anterior al 15 de agosto o el martes o miércoles después de ese 15 de agosto). Dicha flexibilidad permite que el régimen de dosificación sea notablemente menos restrictivo y más cómodo para el paciente. Preferiblemente, las administraciones se realizan sobre una base de intervalos regulares, p. ej. cada 2 semanas. En una realización preferida, dichas administraciones están separadas  
30 aproximadamente 1 mes (o aproximadamente cuatro semanas). En una realización preferida están separadas por 2 semanas (es decir, inyección bi-semanal).

En el contexto de la presente invención en su conjunto, el compuesto FGF-18 se administra al menos 3 veces o al menos 4 veces por ciclo de tratamiento. Preferiblemente, se administra 3 veces o 4 veces por ciclo de tratamiento.

35 En una realización preferida, el compuesto FGF-18, bien sea solo o en combinación con un fármaco antiinflamatorio (como anakinra o diclofenaco), debe administrarse al menos 3 veces consecutivas o al menos 4 veces consecutivas por ciclo de tratamiento. En otra realización preferida, el compuesto FGF-18, bien sea solo o en combinación con un fármaco antiinflamatorio (tal como anakinra o diclofenaco), se administra por 3 veces consecutivas, o 4 veces consecutivas por ciclo de tratamiento. En una realización incluso preferida, se administra por 3 veces consecutivas.

40 En el contexto de la presente invención en su conjunto, dicho tratamiento puede comprender varios ciclos de tratamiento por año, tal como 1, 2 o 3 ciclos de tratamiento por año. En una realización preferida, tal tratamiento comprende 2 ciclos por año. Como alternativa, el tratamiento comprende 1 ciclo por año, repetido 1 año o 2 años después del comienzo del primer ciclo de tratamiento. Como ejemplo, si un tratamiento comprende 1 ciclo, dicho tratamiento puede consistir en 3 inyecciones a intervalos de 2 semanas cada una. Como ejemplo adicional, si un  
45 tratamiento que comprende al menos 2 ciclos, consistiendo un primer ciclo de tratamiento en 3 inyecciones en intervalos de 2 semanas cada una, puede ser seguido, varios meses después de la última inyección de dicho ciclo, por un segundo ciclo de tratamiento de 3 inyecciones a intervalos de 2 semanas cada una.

El compuesto FGF-18 de la invención se elige preferiblemente entre el grupo que consiste en a) un polipéptido que comprende o que consiste en la forma madura de FGF-18 humano que comprende los restos 28 a 207 de SEQ ID NO: 1, o b) un polipéptido que comprende o que consiste en FGF-18 (170 AA) (SEQ ID NO: 2). En particular, este  
50 compuesto se elige entre FGF-18 maduro de tipo silvestre humano o trFGF-18. Dicho compuesto aumenta la deposición de cartílago y permite la reparación de dicho cartílago.

En otra realización preferida, el tratamiento comprende la administración del compuesto FGF-18 a una dosis de 3 - 600 microgramos ( $\mu\text{g}$  o  $\text{mcg}$ ), preferiblemente 3 - 300  $\mu\text{g}$ , o preferiblemente 10 - 200  $\mu\text{g}$ , o más preferiblemente 30 -

150 µg, o incluso más preferiblemente 30 - 120 µg por administración intraarticular individual. En una realización preferida, el tratamiento comprende la administración a una dosis de aproximadamente 3, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 90, 100, 120, 150, 180, 200, 240 o 300 µg por administración intraarticular individual del compuesto FGF-18. Las dosis preferidas incluyen 10, 20, 30, 60, 90, 120, 180, 240 o 300 µg por administración intraarticular individual del compuesto FGF-18. Debe entenderse que la dosis del compuesto FGF-18 a administrar será diferente si el paciente a tratar es un mamífero humano o no humano. Por ejemplo, para perros, la dosis será preferiblemente 5 veces menos importante que para humanos. Como ejemplo, si la dosis humana está en el intervalo de 30 a 120 µg por administración intraarticular individual, la dosis para un perro podría oscilar entre 5 y 20 µg por administración intraarticular individual. Se pueden encontrar ejemplos de dosificación para ratas y conejos en las secciones de ejemplos.

En el contexto de la presente invención en su conjunto, el compuesto FGF-18 puede usarse en combinación con un fármaco antiinflamatorio con efectos sobre los síntomas (dolor y función). El fármaco antiinflamatorio preferido es anakinra (véase SEC ID N° 3) o diclofenaco. Cuando se administra uno cualquiera de los fármacos anakinra o diclofenaco, el tratamiento comprende la administración en una dosis de 0,01 - 500 miligramos (mg), preferiblemente 0,1 - 250 mg, o más preferiblemente 0,5 - 150 mg por administración individual, ya sea intraarticular (vía preferible para anakinra, por ejemplo) u oral (forma preferible para el diclofenaco, por ejemplo). En una realización preferida, el tratamiento comprende la administración a una dosis de aproximadamente 0,03, 0,1, 0,25, 0,3, 0,5, 1, 1,5, 2,5, 10, 15, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 150, 200, 250 o 300 mg por administración individual del fármaco antiinflamatorio. Las dosis preferidas incluyen 0,5, 1, 5, 1,5, 10, 50, 100 y 150 mg por administración individual. Debe entenderse que la dosis de fármaco antiinflamatorio que se ha de administrar será diferente si el paciente a tratar es un mamífero humano o no humano. Por ejemplo, para perros, la dosis será preferiblemente 6 veces menos importante que para seres humanos. Como ejemplo, si la dosis humana de anakinra es de 150 mg por administración intraarticular individual, la dosis para un perro podría ser de 25 mg por administración intraarticular individual. El médico adaptará el régimen de dosificación para el fármaco antiinflamatorio caso por caso, dependiendo del paciente y del fármaco antiinflamatorio a administrar. Por ejemplo, para diclofenaco administrado por vía oral, el régimen de dosificación puede ser de 50 o 75 mg, dos o tres veces al día.

Los compuestos FGF-18 pueden formularse como una composición farmacéutica, es decir, junto con un vehículo, excipientes o similares farmacéuticamente aceptables. Se entiende que la definición de "farmacéuticamente aceptable" abarca cualquier vehículo, excipientes o similares, que no interfieren con la eficacia de la actividad biológica del ingrediente activo y que no es tóxico para el paciente al que se administra. Por ejemplo, para administración parenteral, la proteína o proteínas activas se pueden formular en una forma de dosificación unitaria para inyección en vehículos tales como solución salina, solución de dextrosa, albúmina de suero y solución de Ringer. Las formulaciones para aplicación intraarticular cumplirán con la mayoría de los requisitos que también se aplican a otras formulaciones de inyección, es decir, necesitan ser estériles y compatibles con las condiciones fisiológicas en el sitio de aplicación (por ejemplo, articulación de la rodilla, fluido sinovial). Los excipientes usados para inyección intraarticular pueden también estar presentes en otras formulaciones de inyección, por ejemplo, para aplicación intramuscular o subcutánea. Tales formulaciones de compuestos FGF-18, que incluyen al menos otro vehículo, excipiente o similar farmacéuticamente aceptable, también se denominan en el presente texto "composiciones FGF-18" o "formulaciones FGF-18". Dichas "composiciones FGF-18" o "formulaciones FGF-18" también son útiles en el contexto de la presente invención.

Si se usa un fármaco antiinflamatorio, como anakinra o diclofenaco, junto con un compuesto FGF-18, puede añadirse a la formulación del compuesto FGF-18 antes de la administración, o puede co-administrarse usando 2 jeringas/aguja diferentes, o usando 2 jeringas diferentes, pero preferiblemente la misma aguja para aumentar el confort del paciente. Alternativamente, el fármaco antiinflamatorio puede administrarse por vía oral o por cualquier otra vía de administración.

Los compuestos FGF-18, tales como trFGF-18, y las composiciones que contienen compuestos FGF-18 ("composiciones de FGF-18") serán útiles para tratar trastornos del cartílago. En particular, puede ser útil para tratar defectos del cartílago articular en articulaciones sinoviales que son, por ejemplo, debidos a una fibrilación superficial (osteoartritis precoz), degeneración del cartílago debida a la osteoartritis y defectos condrales u osteocondrales debidos a una lesión o enfermedad. Los compuestos y composiciones FGF-18 pueden también ser útiles para tratar enfermedades articulares causadas por osteocondritis disecante y enfermedades articulares degenerativas. En el campo de la cirugía reconstructiva y plástica, los compuestos y las composiciones FGF-18 serán útiles para la expansión y transferencia de cartílago autógeno o alogénico para la reconstrucción de extensos defectos de los tejidos. Las composiciones FGF-18 se pueden usar para reparar el daño del cartílago junto con el lavado de la articulación, la estimulación de la médula ósea, la artroplastia por abrasión, la perforación subcondral o la microfractura del hueso subcondral. La co-administración opcional con un fármaco antiinflamatorio con efectos sobre los síntomas (dolor y función), tal como la anakinra o el diclofenaco, disminuiría el dolor asociado con el trastorno del cartílago a tratar.

En una realización preferida, el trastorno del cartílago a tratar de acuerdo con la invención es la osteoartritis, tal como la osteoartritis de rodilla o la osteoartritis de cadera. La osteoartritis a tratar puede ser, por ejemplo, y sin limitarse a ella, osteoartritis primaria o artrosis secundaria, así como a la osteoartritis que se clasifica como estadio 1 a estadio 4, o grado 1 a grado 6 de acuerdo con el sistema de clasificación de la OARSI.

En una otra realización preferida, el trastorno del cartílago a tratar de acuerdo con la invención es una lesión del

cartílago con y sin intervenciones quirúrgicas, tales como microfracturas. Además, después del crecimiento del cartílago debido a la administración de la composición de FGF-18 (administrada sola o junto con un fármaco antiinflamatorio como anakinra o diclofenaco), puede ser necesario un tratamiento quirúrgico para contornear adecuadamente el cartílago recién formado.

- 5 En una realización preferida, el tratamiento comprende la administración intraarticular del compuesto FGF-18 o la composición de FGF-18, solo o junto con un fármaco antiinflamatorio con efectos sobre los síntomas (dolor y función), como anakinra o diclofenaco. Los compuestos FGF-18 o composiciones de FGF-18 se pueden aplicar solos o junto con un fármaco antiinflamatorio, como anakinra o diclofenaco, mediante inyección directa en el líquido sinovial de la articulación o directamente en el defecto, ya sean solos o complejados con un vehículo adecuado para la liberación prolongada de proteína (por ejemplo, formulaciones de liberación sostenida) o liberación local restringida. Preferiblemente, el modo de administración del compuesto FGF-18, bien sea solo o junto con un fármaco antiinflamatorio, tal como anakinra o diclofenaco descritos en el presente texto, se selecciona entre el grupo que consiste en administración peri-sinovial, administración intra-sinovial, administración peri-articular y administración intra-articular. En una realización preferida, el compuesto FGF-18 descrito en la presente memoria se administra, bien sea solo o junto con un fármaco antiinflamatorio, tal como anakinra o diclofenaco, preferiblemente intrarticularmente (administración dentro de una articulación). El fármaco antiinflamatorio se administra preferiblemente por vía intrarticular (vía preferible para anakinra) u oral (vía preferible para diclofenaco). La administración intraarticular se realiza en una articulación elegida entre la articulación de la cadera, rodilla, codo, muñeca, tobillo, columna, pie, dedo, dedo del pie, mano, hombro, costillas, omóplatos, muslos, espinillas, talones y a lo largo de los puntos óseos de la columna vertebral. En otra realización preferida más, la administración intraarticular se hace en una articulación de la cadera o la rodilla.

#### Descripción de las figuras.

- Figura 1: Esquema del programa de tratamiento. Figura 1 a: régimen de dosificación una vez a la semana; Figura 1b: régimen de dosificación una vez al mes (o cada 4 semanas); Figura 1 c: régimen de dosificación una vez al mes (o cada 4 semanas) +/- unos pocos días de variaciones aceptadas para comodidad del paciente.

Figura 2: Los compuestos FGF-18 evocan la deposición de matriz articular dependiente de la dosis en un modelo OA de rata, ilustrado por cuantificación de la tinción con Safranina-0.

Figura 3: Puntuación articulación total sin fémur.

Figura 4: Puntuación de articulación total.

- Figura 5: Anchura de degeneración del cartílago tibial sustancial.

Figura 6: Concentración celular después de 8 días de cultivo de condrocitos porcinos estimulados o no con IL1 $\alpha$  estimulados o no con IL1 días de cultivo (A) o después de un retraso de 6 horas (B) con rhFGF18 100 ng/ml y/o Anakinra 100 ng/mL. N = 4 para (A) y N = 6 para (B).

Figura 7: Niveles de  $\alpha$ 2MG en el suero a lo largo del tiempo.

- Figura 8: AUC (área bajo la curva) de la diferencia del diámetro articular entre la rodilla objetivo (articulación OA) y la articulación contralateral (rodilla sana) a lo largo del tiempo.

Figura 9: volumen del cartílago (en mm<sup>3</sup>) en la tibia medial.

#### Descripción de las secuencias:

SEQ ID NO.1: Secuencia de aminoácidos del FGF-18 humano nativo.

- SEQ ID NO.2: Secuencia de aminoácidos del FGF-18 truncado recombinante (trFGF-18).

SEQ ID NO.3: Secuencia de aminoácidos del antagonista del receptor de iL-1 humano recombinante (anakinra).

#### Ejemplos.

##### Material.

- El FGF-18 truncado recombinante (trFGF-18) de los presentes ejemplos se ha preparado por expresión en *E. coli*, de acuerdo con la técnica descrita en la solicitud WO2006/063362. En los siguientes ejemplos, trFGF-18 y FGF-18 se usan indistintamente.

El antagonista del receptor de interleucina-1 humana recombinante (anakinra) se ha obtenido de Pharmacia.

##### Puntuación de las articulaciones.

Después del sacrificio, se retiró la rodilla derecha y se descalcificó en ácido fórmico al 5% durante 4 - 6 días antes de



cortarla por la mitad en el plano frontal e incrustarla en cera de parafina. Se cortaron tres secciones en pasos de 200  $\mu\text{m}$ , se tiñeron con azul de toluidina y se analizaron usando el software ImagePro Plus™ (Media Cybernetics).

Al puntuar las tres secciones de la articulación, se determinó el peor de los casos para las dos mitades en cada portaobjetos para la lesión del cartílago como el ancho de degeneración del cartílago ( $\mu\text{m}$ ). Esto refleja las áreas de lesión del cartílago tibial en las que la pérdida de condrocitos y proteoglicanos se extiende  $\geq 50\%$  del grosor del cartílago. La medición se realizó sobre el área de gravedad de lesión más grande en cada una de las tres zonas a través de la superficie tibial.

Se determinó un grupo de tratamiento con una media  $\pm$  SE para cada puntuación y medida.

Los datos se analizaron usando un análisis de varianza de una vía (ANOVA de 1 vía) o *test* de Kruskal-Wallis (no paramétrico), junto con un *test* posterior de comparación múltiple apropiado. Las medidas del calibrador de la rodilla derecha se compararon con las de la izquierda usando una prueba t de Student. A menos que se indique lo contrario, Bolder BioPATH, Inc. solo realiza análisis estadísticos en datos en bruto (no transformados). Las pruebas estadísticas establecen ciertas suposiciones relativas a la normalidad y la homogeneidad de la varianza de los datos, y es posible que se requieran análisis adicionales si las pruebas dieron como resultado violaciones de estas suposiciones. La significación de todas las pruebas se estableció en  $p \leq 0,05$ . Se hicieron comparaciones entre cada grupo y el grupo de control del vehículo, así como entre pares.

*Ejemplo 1.*

**Método:** la transección del ligamento cruzado anterior con resección del modelo de menisco medial (ACLT + tMx) de OA inducida por inestabilidad, se realizó en ratas Lewis macho de 10 - 15 semanas de edad. Brevemente, bajo anestesia con Isoflurane, se abrió la cápsula articular de la rodilla derecha de cada rata, los ligamentos cruzado anterior y de fijación del menisco se seccionaron bruscamente, se extrajo el menisco y se cerraron la cápsula, los músculos y la piel mediante suturas. Los animales fueron distribuidos aleatoriamente en 10 grupos de  $n = 10$  cada uno. Después de las dosis se investigaron 0, 0,3, 1, 3 y 10  $\mu\text{g}$  por inyección intraarticular. Los grupos 1 a 5 recibieron un ciclo de tres inyecciones individuales en intervalos semanales, los grupos 6 a 10 tres inyecciones individuales en intervalos mensuales. El tratamiento intraarticular se inició tres semanas después de la cirugía. En ese momento, los cambios fisiopatológicos son ya manifiestos, por ejemplo la pérdida de matriz del cartílago. Los animales fueron sacrificados por eutanasia 17 semanas después de la cirugía y se investigaron las articulaciones.

**Resultados:** El trFGF-18 indujo una neoformación de tejido cartilaginoso dependiente de la dosis que se hizo significativa en la tibia lateral con 1  $\mu\text{g}$ /articulación independientemente del régimen de inyección (véase la Figura 2a). El trFGF-18 indujo una neoformación de tejido cartilaginoso dependiente de la dosis que se volvió significativa en la tibia medial con 1  $\mu\text{g}$ /articulación de acuerdo con un régimen semanal y con 0,3  $\mu\text{g}$ /articulación de acuerdo con el régimen mensual (véase la Figura 2b).

*Ejemplo 2*

**Método:** Las ratas Lewis macho se sometieron a cirugía (bajo anestesia con isoflurano) para inducir un desgarro meniscal medial en la articulación de la rodilla derecha. Se administró a los animales IA con vehículo o FGF-18 en uno de dos regímenes diferentes (véase la tabla que sigue), luego se terminó el día 105. Se tomaron medidas de calibre de las rodillas en la línea base al inicio del estudio y los días 21, 42, 56, 84 y 105. El suero se evaluó en relación con los niveles de macroglobulina  $\alpha 2$  en la línea base y en los días 21 y 105, así como una semana después de la dosis final (día 42 o 84). as rodillas derechas se recolectaron para evolución histopatológica.

Tabla 1: grupos de tratamiento

| Grupo | Número de ratas | Tratamiento (10 $\mu\text{g}$ en 50 $\mu\text{l}$ ) |
|-------|-----------------|---|
| 1     | 10              | Normal + vehículo d21, 35, 49                       |
| 2     | 10              | Cirugía + vehículo d21, 35, 49                      |
| 3     | 10              | Cirugía + FGF-18 d21, 28, 35 (tratamiento semanal)  |
| 4     | 10              | Cirugía + FGF-18 d21, 35, 49 (bi-semanal)           |
| 5     | 10              | Cirugía + FGF-18 d21, 49, 77 (tratamiento mensual)  |
| 6     | 10              | Cirugía + FGF-18 d21, 35                            |
| 7     | 10              | Cirugía + FGF-18 d21, 77                            |

**Resultados y conclusiones:** Todos los animales reasumieron la carga con peso inmediatamente después de la cirugía

al recuperarse de la anestesia. Todos los animales ganaron peso a lo largo del estudio y no hubo diferencias significativas en el cambio de peso corporal entre los grupos.

Los diámetros de rodilla medidos mediante el calibre y los niveles séricos de a2MG aumentaron después de las inyecciones de FGF-18 pero en este estudio usando estos parámetros no se demostró una clara ventaja de un régimen de tratamiento específico sobre otro. En cambio, el beneficio estructural fue el más alto con el esquema de inyección mensual (Figuras 3, 4, 5). El esquema de inyección bi-semanal es también prometedor y proporciona ventajas estructurales interesantes.

Globalmente, los resultados de este estudio indican que el tratamiento con FGF-18, al margen del régimen, aumentó significativamente la hinchazón en la rodilla tratada después de la primera inyección. La evaluación histopatológica indicó que el tratamiento aumentaba generalmente la extensión de la lesión sobre la superficie tibial, en particular en términos de daño del colágeno, al tiempo que reducía su gravedad. Este efecto fue lo más evidente en los grupos de tratamiento que recibieron tres dosis en vez de dos, y en grupos que recibieron su dosis final en el último punto temporal (día 77). Se observaron otros diversos efectos secundarios del tratamiento, que incluyen hipertrofia del cartílago, sinovitis y fibrosis sinovial. Estos cambios fueron más evidentes y severos en los animales que recibieron tres dosis en sucesión rápida (Grupos 3 y 4), mientras que los animales que recibieron solo dos dosis (Grupos 6 y 7) o recibieron sus dosis durante un período mayor (Grupo 5) tuvieron cambios ligeramente menos severos. El régimen de tratamiento que tuvo como resultado la mejor morfología general fue el de las tres inyecciones, una vez al mes (Grupo 4, inyecciones los días 21, 49 y 77), lo que indica que algo de tiempo de recuperación entre las dosis era beneficioso. Alternativamente, el régimen de tratamiento de tres inyecciones, una vez cada 2 semanas (Grupo 5; inyecciones los días 21, 35 y 49), tuvieron por resultado una buena morfología global.

*Ejemplo 3.*

**Métodos:** Para este estudio se utilizaron 60 conejos blancos machos adultos, naive, de Nueva Zelanda. Los animales tenían aproximadamente 3 - 4 meses de edad. Los conejos se sometieron a la creación del defecto del cartílago en la rodilla derecha. Se hizo un defecto de espesor completo de 2 mm por 6 mm en el cartílago articular del surco troclear. La microfractura se creó con agujas de calibre 18, se realizaron dos microfracturas de 3 mm de espesor a través del hueso subcondral en la base del defecto, una proximal y otra distal. Cada orificio de microfractura tenía aproximadamente 1,5 mm de diámetro y los orificios separados 2 mm.

El experimento consistió en los seis grupos de tratamiento que siguen, con 10 animales en cada grupo para un total de 60 conejos (Tabla 2). Los conejos de los Grupos 3, 4, 5 y 6 fueron tratados con rhFGF18 intraarticular en un ciclo de tres inyecciones semanales de 100 µg de rhFGF18 (Grupo 3 y 5) o bien un ciclo de tres inyecciones mensuales de 100 µg de rhFGF18 (Grupo 4 y 6) Todos los animales fueron sacrificados por eutanasia y sometidos a necropsia seis meses después de la cirugía.

Tabla 2: grupos de tratamiento

| Grupo n° (n=10) | Defecto del cartílago | Micro-fractura | Artículo de ensayo y programa de tratamiento | Dosis µg/inyección (trFGF-18) | Concentración de trFGF-18 (µg/ml) | Volumen (ml/ articulación) | Día de la dosis |
|-----------------|-----------------------|----------------|--|-------------------------------|-----------------------------------|----------------------------|-----------------|
| 1               | Si                    | No             | Ninguno                                      | 0                             | NA                                | NA                         | NA              |
| 2               | Si                    | Si             | Ninguno                                      | 0                             | NA                                | NA                         | NA              |
| 3               | Si                    | No             | rhFGF18 (1x semana durante 3 semanas)        | 100                           | 500                               | 0,2                        | Día 7, 14, 21   |
| 4               | Si                    | No             | 1x/ mes durante 3 meses)                     | 100                           | 500                               | 0,2                        | Día 28, 56, 84  |
| 5               | Si                    | Si             | rhFGF18 (1x / semana durante 3 semanas)      | 100                           | 500                               | 0,2                        | Día 7, 14, 21   |
| 6               | Si                    | Si             | 1x/ mes durante 3 meses)                     | 100                           | 500                               | 0,2                        | Día 28, 56, 84  |

**Resultados:**

**Hallazgos de la necropsia** (Tabla 3): La puntuación del cartílago en bruto del ICRS fue  $1,9 \pm 0,3$  SE para los animales

del Grupo 5 y  $2,4 \pm 0,2$  SE para los animales del Grupo 6, lo que indica que el esquema de inyección mensual fue superior en comparación con el esquema solamente semanal. En los animales del Grupo 6, el surco intercondilar se rellenó en 3/10 animales con cartílago de finamente granular a granular, los restantes 7/10 animales tenían el surco rellenado desde el 50% hasta casi completamente lleno con cartílago de finamente granular a granular. En resumen, la inyección de rhFGF18 solo o en combinación con microfractura, administrada como una inyección semanal o mensual única, tuvo como resultado un engrosamiento o agrandamiento de la región del cóndilo femoral y una proliferación de surcos ásperos o groseramente granulares en la lesión del surco intercondilar y la estimulación de osteofitos en las crestas trocleares medial y lateral, formación ocasional de osteofitos en la meseta tibial, o crecimiento anómalo del cartílago en la rótula o adyacente a la rótula en la almohadilla de grasa sinovial.

10 *Patología morfológica cuando no hay microfractura:* Secciones de lesión del fémur derecho de animales tratados mensualmente durante tres meses con rhFGF18 tenían porcentajes de relleno de defectos (48%) significativamente aumentados, lo que tiene como resultado un aumento significativo del 49% en la puntuación de relleno de defectos. Otras puntuaciones aumentaron de forma no significativa en un 20 - 23%. La anchura total de la lesión del surco aumentó no significativamente en un 36%, mientras que el ancho de la lesión sin cartílago viable se vio disminuido significativamente en un 94%. Todas las secciones presentaban una degeneración que oscilaba entre mínima y severa, era generalmente focal y típicamente se observaba junto con fibrocartílago. El grosor central de MFC aumentó significativamente en un 120%.

15 *Patología morfológica cuando hay microfractura:* Las secciones del área de la lesión del cartílago de los controles no tratados con microfractura tuvieron una reconstitución moderada global de la unión osteocondral, una tinción de la matriz moderadamente reducida y un 50% de relleno del defecto. La morfología celular fue en su mayor parte fibrocartílago.

20 Las secciones del área de lesión de animales tratados semanalmente durante tres semanas con rhFGF18 tuvieron aumentos significativos del 44 - 69% (hacia lo normal) en todos los parámetros puntuados, así como el porcentaje de relleno del defecto. Las puntuaciones sumadas se incrementaron significativamente en un 53%. El ancho total de la lesión del surco aumentó ligeramente en un 5%, mientras que el ancho de la lesión sin cartílago viable disminuyó (no significativamente) en un 59%. Todas las secciones tenían hipertrofia del cartílago. El grosor de MFC central en estas secciones aumentó significativamente en un 112%. Las secciones del área de la lesión de animales tratados mensualmente durante tres meses con rhFGF18 tuvieron un aumento significativo del 61 - 97% (hacia el normal) en todos los parámetros puntuados, así como el porcentaje de relleno del defecto. Las puntuaciones sumadas aumentaron significativamente en un 76%. El ancho total de la lesión del surco y el ancho de la lesión sin cartílago viable no disminuyeron significativamente en un 19% y 69%, respectivamente. Todas las secciones tenían hipertrofia del cartílago. El grosor de MFC central en estas secciones aumentó significativamente en un 106%.

#### Conclusiones:

35 Los signos clínicos anormales fueron leves y consistentes con los observados típicamente en conejos después de una cirugía de rodilla y/o como resultado de la recogida repetitiva de muestras, bien sea sangre recogida de las venas de la oreja, o bien líquido sinovial recogido de la articulación de la rodilla. La comparación de la curación de los surcos intercondilares de los animales del Grupo 1 y del Grupo 2 mostró un buen llenado espontáneo del surco con lo que groseramente parece ser el cartílago. Hay una sugerencia de que la microfractura puede potenciar el rebrote del cartílago en el surco ya que 9/10 animales del Grupo 2 tenían el relleno del surco con cartílago en comparación con 7/10 animales del Grupo 1, pero esta diferencia es escasa.

40 Del mismo modo, no hay diferencia entre las puntuaciones de ICRS o de osteofitos entre los dos grupos, por lo que la calidad de la cicatrización del cartílago fue buena, y había poca estimulación de formación de osteofitos en cualquiera de los grupos. De los grupos restantes tratados con rhFGF18, parece que el Grupo 4 (surco intercondilar y tres inyecciones intraarticulares mensuales de 100  $\mu$ g de rhFGFI 8) mostró la mejor respuesta, teniendo 6/9 animales el surco intercondilar lleno de cartílago que parecía entre casi normal y ligeramente rugoso o granular en apariencia grosera. Además, el Grupo 4 tuvo la puntuación de cartílago ICRS más baja ( $2,1 \pm 0,3$ ) de los cuatro grupos tratados con rhFGF18, y este grupo tuvo la puntuación osteofítica más baja ( $3,8 \pm 0,8$ ) de cualquiera de los grupos rhFGF18. En cambio, el grupo 6 (surco intercondilar con microfractura y tres inyecciones intraarticulares mensuales de 100  $\mu$ g de rhFGF18) tenía un surco intercondilar relleno en solo 3/10 animales, la puntuación ICRS fue la más elevada de cualquier grupo ( $2,4 \pm 0,2$ ) y la puntuación osteofítica fue la segunda más elevada ( $5,1 \pm 0,7$ ) de cualquier grupo tratado con rhFGF18. Del mismo modo, el grupo 5 (surco intercondilar con microfractura y tres inyecciones intraarticulares semanales de 100  $\mu$ g de rhFGF18) tuvo la puntuación osteofítica más alta de cualquier grupo ( $5,7 \pm 0,7$ ).

55 Los efectos beneficiosos fueron mayores cuando se administró el tratamiento a lo largo de un período de tiempo prolongado, y los efectos fueron más evidentes en los conejos con microfracturas que en los conejos sin microfracturas.

*Ejemplo 4.**Método:*

5 Se aislaron condrocitos porcinos del cartílago de una cabeza femoral de la cadera de cerdo (el cerdo tenía aproximadamente un año de edad). Después de la disección de las articulaciones, se recolectó el cartílago y se digirió 45 minutos con colagenasa al 0,25% (dilución 1/10 de colagenasa NBG4 2,5 % en F12 de Ham) a temperatura ambiente. Las células sueltas se descartaron y el cartílago se digirió adicionalmente durante la noche con colagenasa al 0,1% (dilución 1/25 de colagenasa NBG4 al 2,5% en F12 de Ham) a 37 °C para extraer los condrocitos. Para este estudio, los condrocitos se cultivaron en monocapa.

10 Los condrocitos porcinos primarios articulares se estimularon o no con 10 ng/mL de IL1 $\alpha$ , e inmediatamente o 6 horas después se trataron con 100 ng/mL de anakinra y/o con 100 ng/mL de trFGF-18. Cada condición se realizó en 4 o 6 replicados. Como control, las células se cultivaron también con anakinra sola, trFGF-18 solo o en ausencia de cualquier tratamiento (Medio).

15 Precultivo: Después del aislamiento de las células se inocularon condrocitos porcinos a razón de 20.000 células/cm<sup>2</sup> y se cultivaron durante una semana en F12 de Ham completo. Las células se recolectaron con Accutase, se contaron y se utilizaron como se describe a continuación.

20 Para las células tratadas directamente con anakinra: Se inocularon condrocitos en una placa de 24 pocillos a razón de 15.000 células/pocillo en 0,5 mL de F12 de Ham completo. Luego se añadieron a las células 0,25 mL de trFGF-18 400 ng/mL y/o 0,25 mL de anakinra 400 ng/mL. En las muestras estimuladas, también se añadieron a las células 10  $\mu$ L de IL1 $\alpha$  a razón de 1.000 ng/mL. Se diluyeron trFGF-18, anakinra e IL 1 $\alpha$  en F12 de Ham completo.

El volumen final en el pocillo de cultivo se ajustó a 1 mL con F12 de Ham completo. Las concentraciones finales fueron 10 ng/mL de IL1 $\alpha$ , 100 ng/mL de trFGF-18 y 100 ng/mL de anakinra, y el tiempo de cultivo total fue de ocho días. Se realizó un cambio de medio completo al cabo de cuatro días. N = 4.

25 Para células tratadas con anakinra y trFGF-18, 6 horas después del reto con IL1 $\alpha$ : Se inocularon condrocitos en una placa de 24 pocillos a razón de 15.000 células/pocillo en 1 mL de F12 de HAM completo que contenía o no IL1 $\alpha$  10 ng/mL. Después de 6 horas, se retiró el medio y se reemplazó con 0,25 mL de trFGF-18 400 ng/mL y/o 0,25 mL de anakinra 400 ng/mL. En las muestras estimuladas, también se añadieron 0,25 mL de IL1 $\alpha$  a 40 ng/mL a las células. Se diluyeron trFGF-18, anakinra e IL1 $\alpha$  en F12 de HAM completo. El volumen final en el pocillo de cultivo se ajustó a 1 mL con F12 de HAM completo. Las concentraciones finales fueron 10 ng/mL de IL1 $\alpha$ , 100 ng/mL de trFGF-18 y 100 ng/mL de anakinra y el tiempo de cultivo total fue de ocho días. Se realizó un cambio de medio completo después de cuatro días. N = 6.

30 Después de ocho días de cultivo, las células se recolectaron con accutasa y las suspensiones celulares resultantes se analizaron en relación con la concentración celular y la viabilidad de las células con un analizador de células ViCell™ (de Beckman Coulter). El análisis estadístico consistió en un ANOVA de 1 vía seguido de un análisis post hoc de Dunnett.

35 *Resultados y conclusiones:*

Como era de esperar, se encontró que el rhFGF18 aumentaba la proliferación de condrocitos porcinos en ausencia de IL1 $\alpha$ . En ambos experimentos, en comparación con el control (medio, sin IL 1 $\alpha$ ), se observó un aumento de 11,25 y 7,75 veces en el número de células en presencia de rhFGF 18 100 ng / mL después de 8 días de cultivo (Figura 6).

40 Sin embargo, en presencia de 10 ng/mL de IL 1 $\alpha$  la estimulación de la proliferación por rhFGF18 fue solo 2,38 y 2,44 veces, respectivamente, en comparación con el control (medio, IL1 $\alpha$ , 10 ng/mL) para ambos experimentos. Se demostró que la anakinra 100 ng/mL, tanto para el tratamiento directo como para el retardado, restablecía completamente la actividad de rhFGF18. Se encontró que la densidad celular para células cultivadas con rhFGF18 y sin IL1 $\alpha$  o estimuladas con IL1 $\alpha$  pero tratadas con anakinra no era estadísticamente diferente. Finalmente, la anakinra sola no tuvo efecto sobre la proliferación de condrocitos.

45 En el presente estudio, se ha demostrado que la anakinra 100 ng/mL bloquea completamente el efecto inhibitorio de IL1 $\alpha$  en la actividad proliferativa de rhFGF18. Esto concuerda con el hecho de que la anakinra es un antagonista del receptor de IL1, bloqueando la señalización inflamatoria desencadenada por IL1. Se ha demostrado actualmente que la anakinra restaura el efecto proliferativo de rhFGF1 8 en condrocitos porcinos estimulados con IL1 $\alpha$ .

*Ejemplo 5.*50 *Método:*

Se sometieron ratas Lewis macho a cirugía para inducir una rotura meniscal medial en la rodilla derecha. Los animales fueron tratados i. a. con FGF-18 (10  $\mu$ g/articulación) los días 21, 28 y 35, y por vía oral con diclofenaco (1 mg/kg o 3 mg/kg) o vehículo los días 21 - 23, 28 - 30 y 35 - 37, luego terminó el día 42 o el día 63. El suero fue recogido y se evaluaron los niveles de alfa 2 macroglobulina ( $\alpha$ 2MG) los días -3, 21, 42 y 63. La  $\alpha$ 2MG es un biomarcador sérico de

inflamación. El vínculo entre  $\alpha$ 2MG y la inflamación ha sido ya demostrado (Kuribayashi et al., 2013).

#### Resultados.

Los controles de FGF-18 + vehículo tuvieron una hinchazón entre leve y moderada el día 24, que aumentó a grave el día 36, aunque no se observó cojera. La hinchazón de la rodilla disminuyó ligeramente a una gravedad marcada comenzando el día 44. Las mediciones con calibrador respaldaron estas observaciones, con diferencias significativas entre las rodillas derecha e izquierda el día 21 y puntos de tiempo más tardíos, pero no en la línea base. Los animales a los que se dieron 3 mg/kg de diclofenaco tuvieron puntuaciones de hinchazón significativamente reducidas los días 24 - 29, 31 y 36 - 43, en comparación con los controles del vehículo. Las medidas con calibre de la rodilla se redujeron significativamente el día 42, pero no se vieron afectadas significativamente en ningún otro punto temporal. Los animales que recibieron 1 mg/kg de diclofenaco tuvieron puntuaciones de hinchazón significativamente reducidas los días 24 - 29, 31 y 36 - 43, en comparación con los controles del vehículo. Las medidas del calibre de la rodilla se redujeron significativamente el día 42, pero no se vieron afectadas significativamente en ningún otro momento (datos no mostrados).

Los niveles de  $\alpha$ 2MG fueron más altos el día -3 (preoperatorio) que el día 21 después de la cirugía. Los niveles en animales a los que se les administró 3 mg/kg de diclofenaco se redujeron de forma leve, pero significativa, en comparación con los controles del vehículo en el punto de tiempo preoperatorio. Los niveles en el día 21, antes del tratamiento, fueron esencialmente los mismos para todos los grupos. En el día 42, los controles de la enfermedad tenían marcadamente elevados los niveles de  $\alpha$ 2MG (niveles aproximadamente cuatro veces el día 21), lo que era una diferencia significativa de los dos grupos de diclofenaco. El día 63, los niveles para todos los grupos fueron nuevamente similares (figura 7).

#### Conclusiones:

Globalmente, los resultados de este estudio indican que la administración de 1 o 3 mg/kg de diclofenaco a ratas con desgarramiento meniscal medial a las que también se administró FGF-18 redujo significativamente la hinchazón de la rodilla, basada tanto en las observaciones clínicas como en las mediciones del calibre. Estos efectos fueron evidentes durante aproximadamente una semana después de la dosis final de diclofenaco. Los niveles en suero de  $\alpha$ 2MG rastrearon los controles del vehículo en los días -3, 21 y 63, si bien se observó una fuerte reducción en el día 42 como resultado de un aumento masivo en los niveles de control.

#### Ejemplo 6

**Método:** El objetivo de este estudio era evaluar el efecto de la diferente frecuencia de dosificación intracíclica de la misma dosificación total (3 x 1  $\mu$ g) de esprifermina sobre el volumen de cartílago en un modelo de rata de OA. La transección del ligamento cruzado anterior (ACLT) con resección del menisco medial (tMx) se realizó como se describe en el ejemplo 1. Se usaron las articulaciones de ratas macho Hooded Rats (200 - 260 g, Charles River) en este estudio. Los animales fueron sacrificados mediante eutanasia 18 semanas después de la cirugía.

Los cambios en la articulación están relacionados con las evaluaciones clínicas en OA (pérdida de cartílago, osteofitos, esclerosis subcondral). Se inyectó 1  $\mu$ g de esprifermina en solución salina tres veces, bien sea semanalmente, o bien cada 2<sup>a</sup>, cada 3<sup>a</sup>, cada 4<sup>a</sup> o cada 5<sup>a</sup> semana, y se compararon con los grupos de vehículos apropiados. El peso corporal, los diámetros de las articulaciones y las puntuaciones de salud clínica se investigaron semanalmente.

#### Resultados:

Los resultados mostraron que las inyecciones intraarticulares no tenían influencia sobre el aumento de peso corporal: no se observó ningún efecto farmacológico o de régimen de tratamiento significativo en el parámetro *in-life*. Sin embargo, los grupos inyectados cada dos semanas con solución salina (n = 4) tuvieron la mayor ganancia de peso corporal (datos no mostrados).

Con inyecciones en la semana 3, 4 y 5, los diámetros articulares fueron significativamente más altos que después de las inyecciones en la semana 3, 8 y 13 (ver figura 8). No se observaron diferencias significativas entre las inyecciones cada 2<sup>a</sup>, 3<sup>a</sup> o 4<sup>a</sup> semana. Cuando se inyectó solamente cada quinta semana, el área bajo la curva de los diámetros de las articulaciones fue la misma que con las inyecciones de solución salina. Así, en tendencia, el AUC del diámetro de la articulación disminuye con una frecuencia de inyección más baja.

El análisis histológico cuantitativo mediante estereología reveló cambios severos similares a la OA en las articulaciones afectadas. El rhFGF18 previno la denudación de cartílago más o menos completa. Un  $\mu$ g/articulación y una inyección administrada una vez cada 3 semanas (tres inyecciones en total) dieron como resultado una diferencia farmacológica estadísticamente significativa sobre la solución salina (punto final: volumen de cartílago en la tibia medial, véase la Figura 9).

#### Conclusiones:

Las frecuencias de inyección inferiores a una vez a la semana durante más de tres semanas parecen permitir una

mejor recuperación de la hinchazón de la articulación después de la inyección. Todos los grupos tratados con rhFGF18 mostraron un beneficio estructural ilustrado por valores de volumen de cartílago más altos en comparación con el placebo. Sin embargo, bajo las circunstancias de un estudio a plazo fijo (la misma duración del estudio para todos los animales) y una dosis fija, la frecuencia de inyección una vez cada 3ª semana tuvo como consecuencia el resultado estructural más ventajoso. Se puede especular que las pausas más largas entre inyecciones de rhFGF18 son más beneficiosas debido a una mejor traducción de la proliferación de condrocitos en la producción de matriz extracelular en comparación con el régimen de inyección semanal a lo largo de tres semanas.

La curva en forma de campana resultante es una observación común para factores de crecimiento de lecturas de la eficacia.

10 **Referencias.**

1. Ellsworth et al., 2002, Osteoarthritis and Cartilage, 10: 308-320
2. Shimoaka et al., 2002, JBC 277 (9): 7493 – 7500
3. WO2008023063
4. WO2004032849
- 15 5. W09816644
6. WO2006063362
7. Custers et al., 2007, Osteoarthritis and Cartilage, 15: 1241 - 1248
8. Lotz, 2010, Arthritis research therapy, 12:211
9. Moore et al., 2005, Osteoarthritis and Cartilage, 13: 623 - 631.
- 20 10. Arnaud-Dabernat et al., 2008, Journal of Cellular Physiology, 216: 261 - 268.
11. The Merck Manual, 17ª edición, 1999
12. Getgood et al., 2010, P116, ICRS Meeting 2010, Barcelona.
13. ICRS Publication: [http://www.cartilage.org/files/contentmanagement/ICRS\\_evaluation.pdf](http://www.cartilage.org/files/contentmanagement/ICRS_evaluation.pdf), página 13.
14. Bingham, 2002, J. Rheumatol. 29: 3 - 9.
- 25 15. Lee et al., 2013, Gene, 527: 440 - 447.
16. Bresnihan, 2002, Ann. Reuma. 61: ii74 - ii77
17. St. Clair, 2002, J. Rheumatol. 29: 22 - 26
18. Mertens et al., 2009, J. Rheumatol., 36 (6): 1118 - 1125
19. Chevalier et al., 2009, Arthritis & Rheumatism, 61 (3): 344 - 352
- 30 20. Kuribayashi et al., 2013, Inflammation, 36 (6): 1448 – 52

**Listado de secuencias**

<110> Merck Patent GmbH

5 <120> Régimen de dosificación del compuesto dFGF-18

<130> P 14/014

<150> EP14000600.8

10 <151> 20.02.2014

<160> 3

<170> PatentIn version 3.3

15

<210> 1

<211> 207

<212> PRT

<213> Homo sapiens

20

<220>

<223> FGF-18 humano

<400> 1

25

```

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

<210> 2

<211> 170

30 <212> PRT

<213> Artificial

ES 2 688 551 T3

<220>

<223> FGF-18(trFGF-18) recombinante truncado

<400> 2

5

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

<210> 3

<211> 153

10

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> antagonista del receptor interleukina-1 recombinante humano (anakinra)

15

<400> 3

Met Arg Pro Ser Gly Arg Lys Ser Ser Lys Met Gln Ala Phe Arg Ile  
 1 5 10 15  
 Trp Asp Val Asn Gln Lys Thr Phe Tyr Leu Arg Asn Asn Gln Leu Val  
 20 25 30  
 Ala Gly Tyr Leu Gln Gly Pro Asn Val Asn Leu Glu Glu Lys Ile Asp  
 35 40 45  
 Val Val Pro Ile Glu Pro His Ala Leu Phe Leu Gly Ile His Gly Gly





**REIVINDICACIONES**

1. Un compuesto FGF-18 para su uso en el tratamiento de un trastorno de cartílago, en donde el compuesto FGF-18 ha de administrarse intra-articularmente al menos tres veces por ciclo de tratamiento, estando dichas administraciones separadas por aproximadamente 2 semanas.
- 5 2. El compuesto FGF-18 para su uso según la reivindicación 1, en donde dichas administraciones están separadas por aproximadamente 2 semanas.
3. El compuesto FGF-18 para su uso según cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en donde el compuesto FGF-18 se ha de administrar al menos 3 veces o al menos 4 veces por ciclo de tratamiento.
- 10 4. El compuesto FGF-18 para su uso según cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en donde los ciclos de tratamiento se repiten después de 2, 3, 4, 5 o 6 meses.
5. El compuesto FGF-18 para su uso según cualquiera de las reivindicaciones precedentes, que comprende 1, 2, o 3 ciclos de tratamiento al año.
- 15 6. El compuesto FGF-18 para su uso según una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en donde el compuesto FGF-18 debe administrarse a una dosis de 3 - 300 mcg, o preferiblemente de 10 - 200 mcg, o más preferiblemente de 30 - 150 mcg, o incluso más preferiblemente 30 - 120 mcg por administración intraarticular única.
7. El compuesto FGF-18 para su uso según la reivindicación 6, en donde el compuesto FGF-18 se ha de administrar a una dosis de aproximadamente 3, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 90, 100, 120, 150, 180, 200, 240 o 300 mcg por administración intraarticular única del compuesto FGF-18.
- 20 8. El compuesto FGF-18 para su uso según cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en donde el cartílago es cartílago articular.
9. El compuesto FGF-18 para su uso según cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en donde el trastorno del cartílago es osteoartritis.
10. El compuesto FGF-18 para su uso según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, en donde el trastorno del cartílago es una lesión del cartílago.
- 25 11. El compuesto FGF-18 para su uso según cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en donde el compuesto FGF-18 se selecciona entre el grupo que consiste en:
  - a) un polipéptido que comprende o que consiste en la forma madura de FGF-18 humano que comprende los restos 28 - 207 de SEQ ID NO: 1, o
  - b) un polipéptido que comprende o que consiste en SEQ ID NO: 2.
- 30 12. El compuesto FGF-18 para su uso según cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en donde el compuesto FGF-18 se administra junto con un fármaco antiinflamatorio.
13. El compuesto FGF-18 para su uso según la reivindicación 12, en donde el fármaco antiinflamatorio es anakinra o diclofenaco.
- 35 14. El compuesto FGF-18 para su uso según la reivindicación 12 o la reivindicación 13, en donde el fármaco antiinflamatorio ha de administrarse a una dosis de 0,001 a 500 mg, o preferiblemente de 0,1 a 250 mg, o más preferiblemente de 0,5 a 150 mg por administración única.
15. El compuesto FGF-18 para su uso según la reivindicación 14, en donde el fármaco antiinflamatorio se ha de administrar a una dosis de 0,03, 0,1, 0,25, 0,3, 0,5, 1, 1,5, 2, 5, 10, 15, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 150, 200, 250 o 300 mg por administración única.
- 40 16. El compuesto FGF-18 para su uso según cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en donde el compuesto FGF-18 se ha de administrar 3 veces por ciclo de tratamiento, estando dichas administraciones separadas por aproximadamente 2 semanas.
17. El compuesto FGF-18 para su uso según cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en donde el compuesto FGF-18 ha de administrarse 3 veces consecutivas.

45

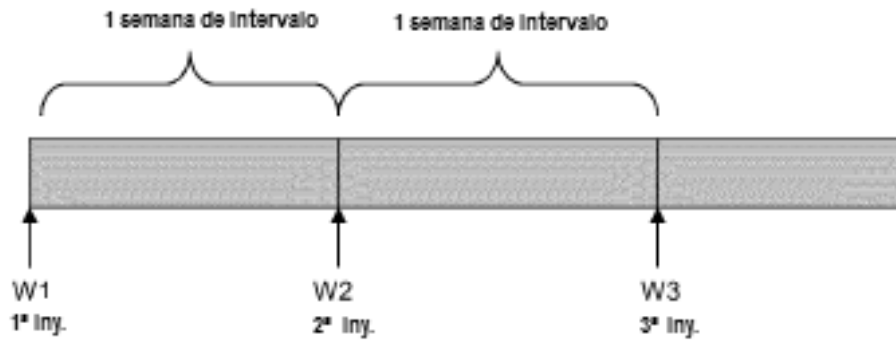


Figura 1a

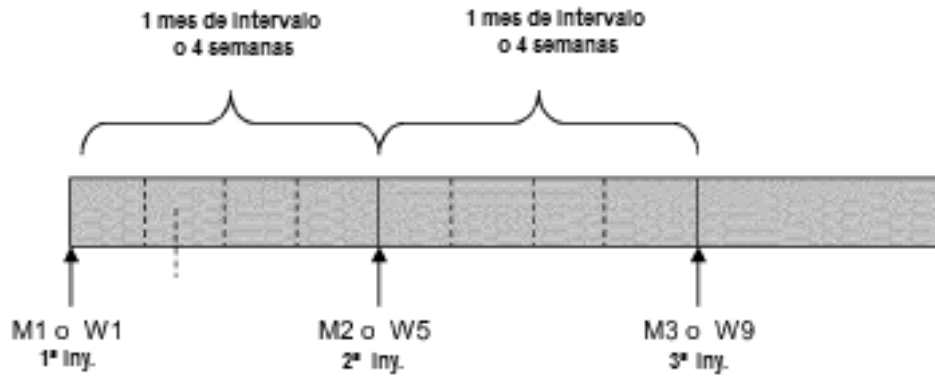


Figura 1b

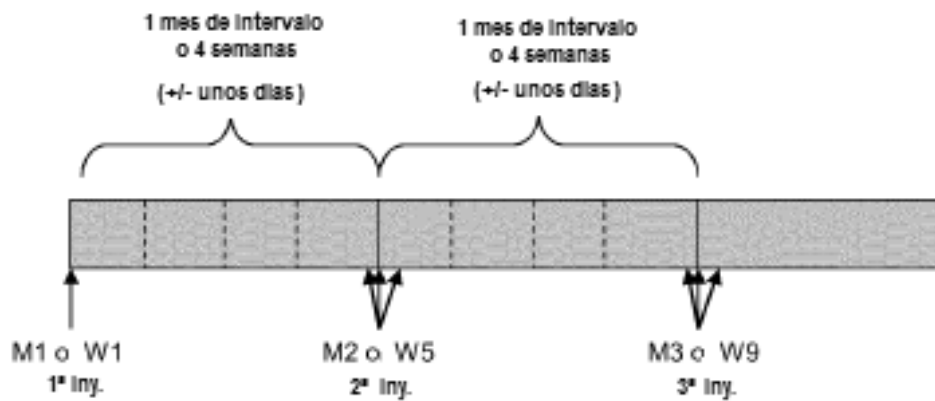
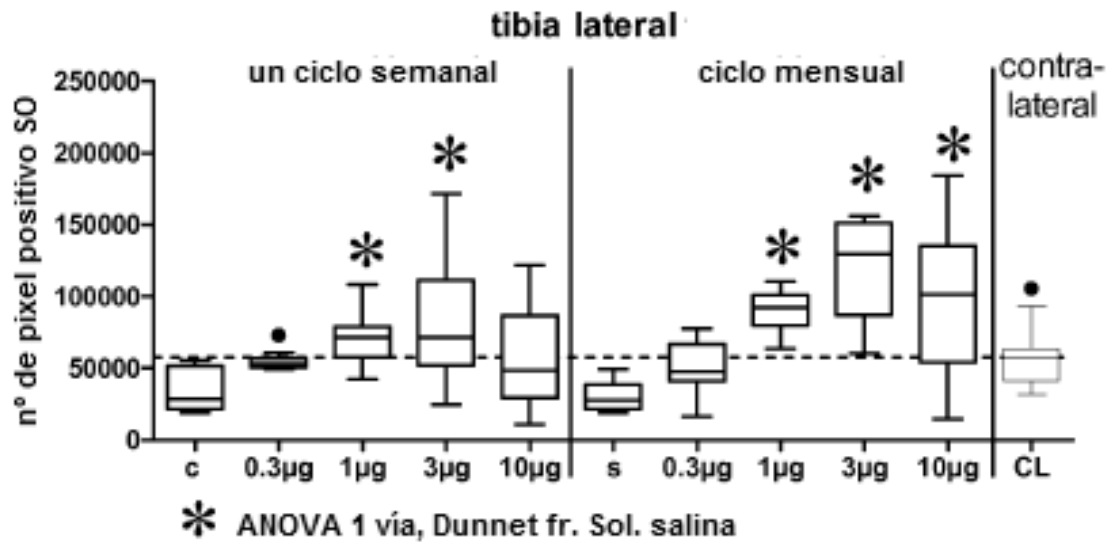
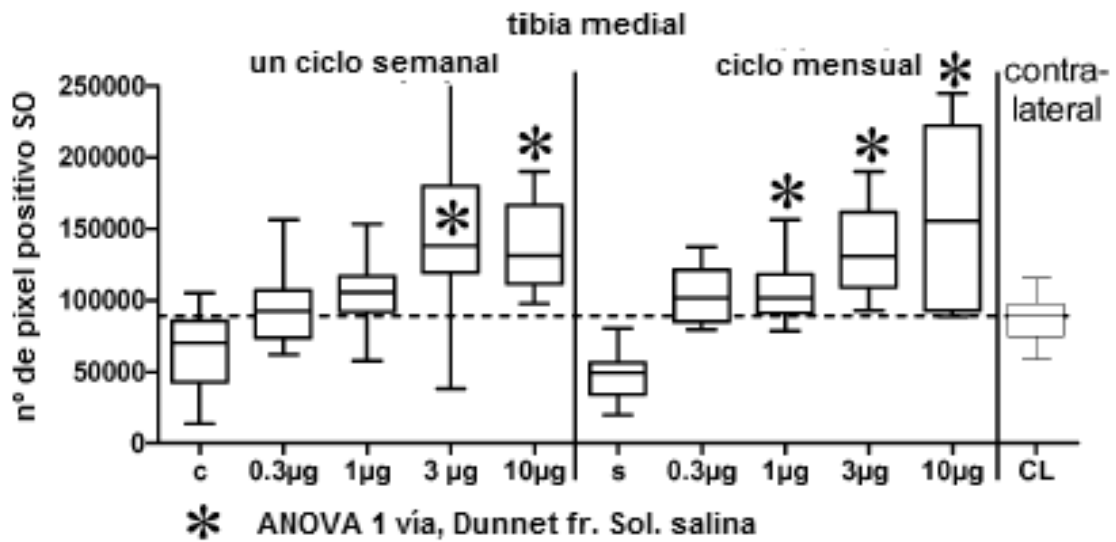


Figura 1c



[Type a quote from the document or the summary of an interesting point. You can position

Figura 2a



[Type a quote from the document or the summary of an interesting point. You can position

Figura 2b

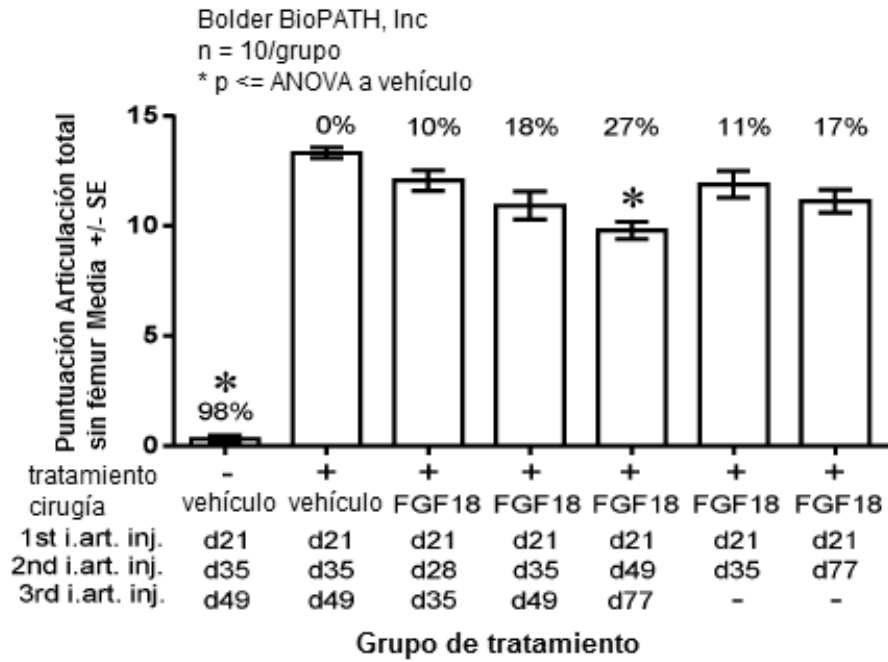


Figura 3

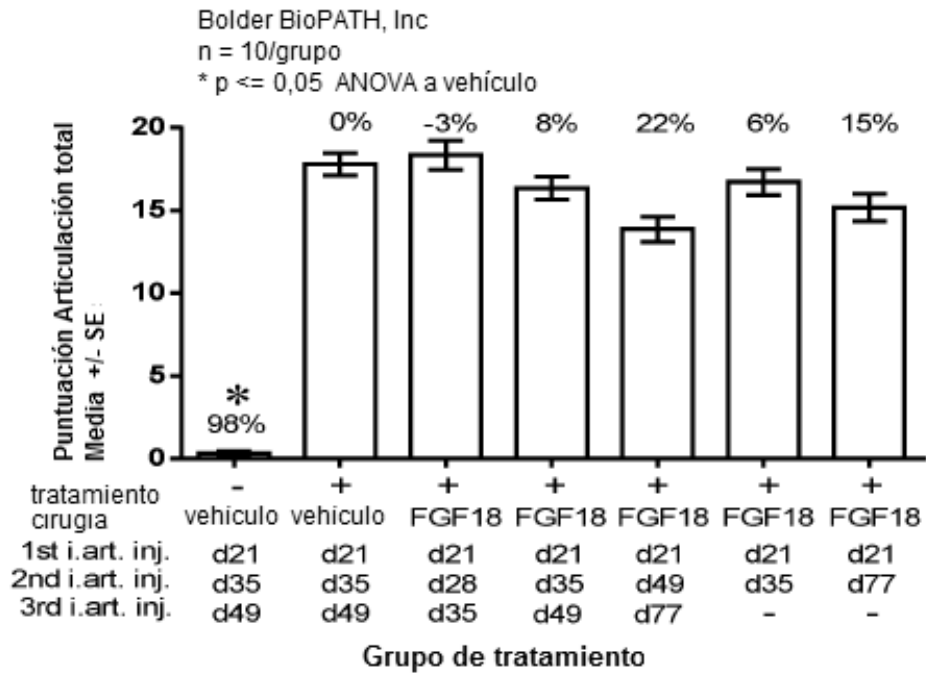


Figura 4

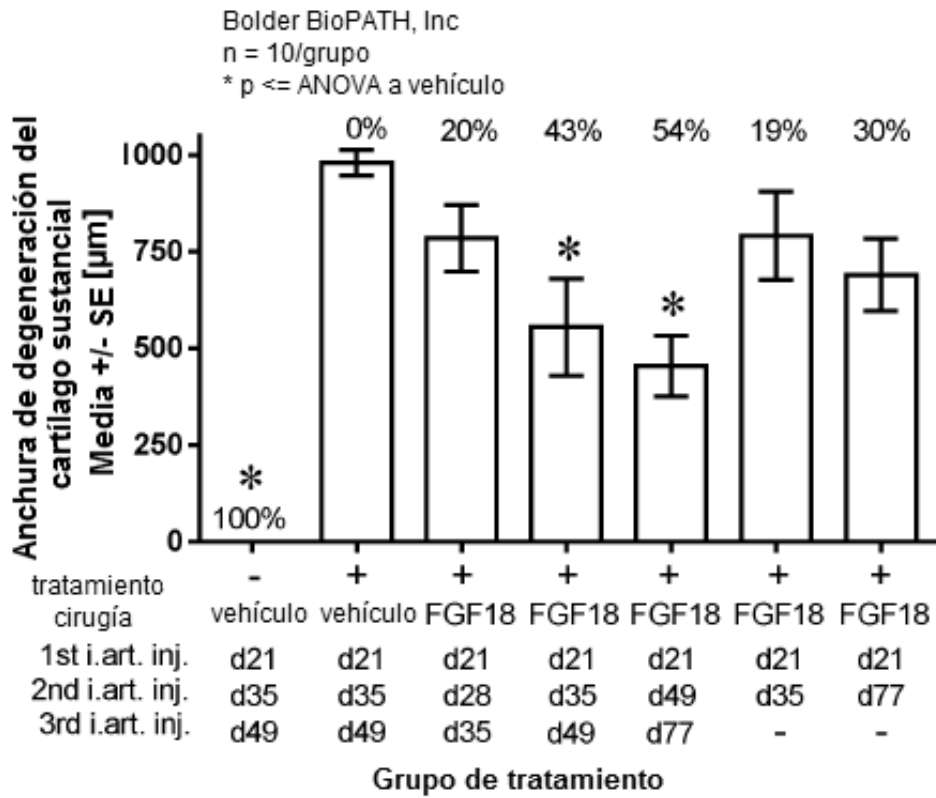


Figura 5

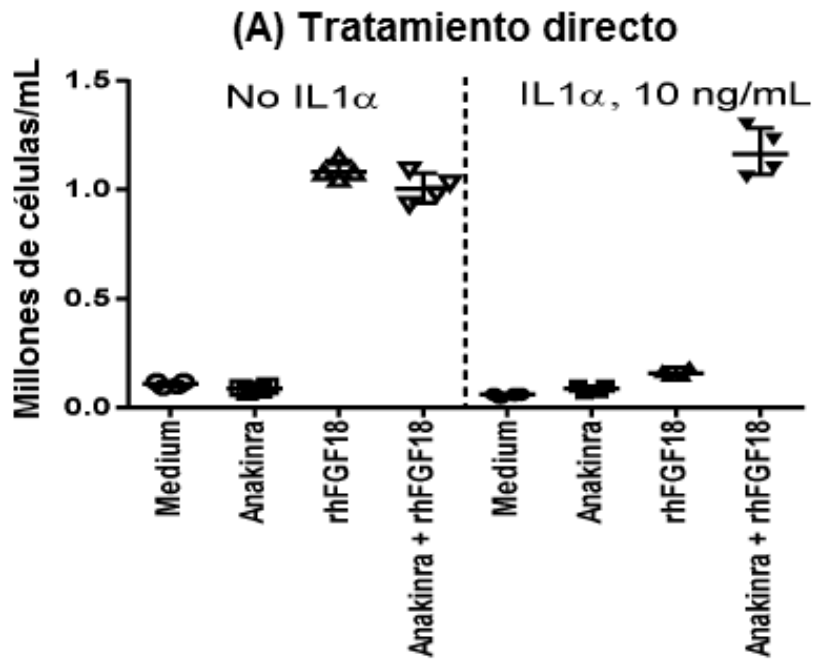


Figura 6a

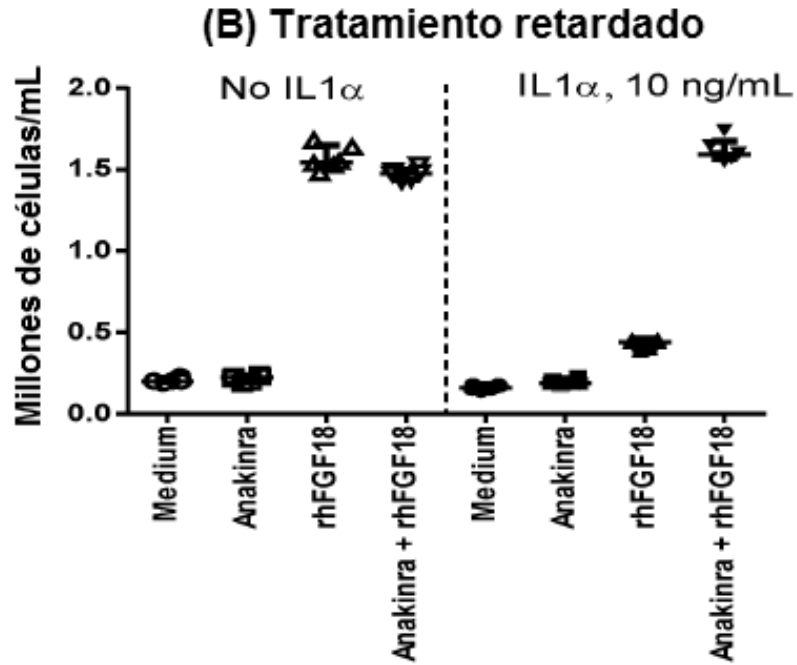


Figura 6b

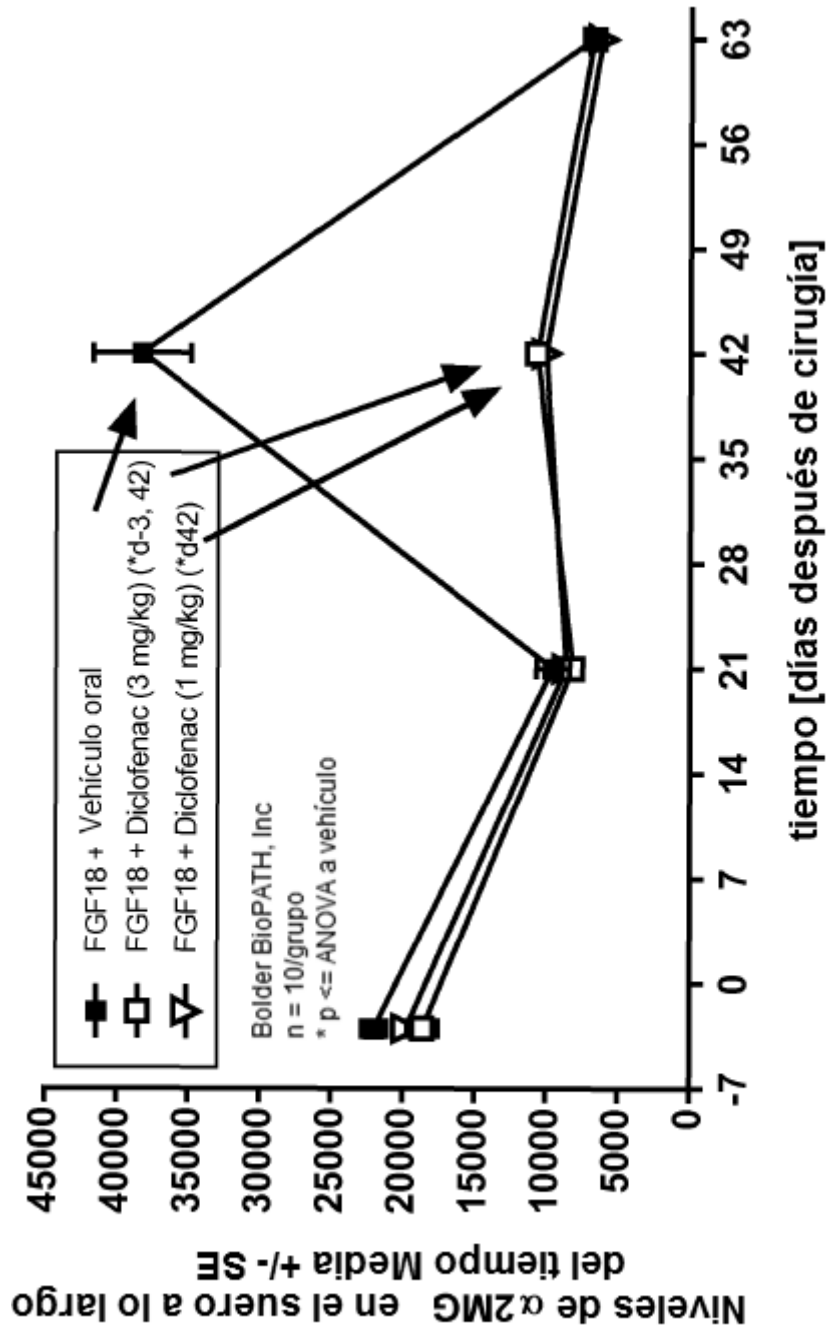


Figura 7



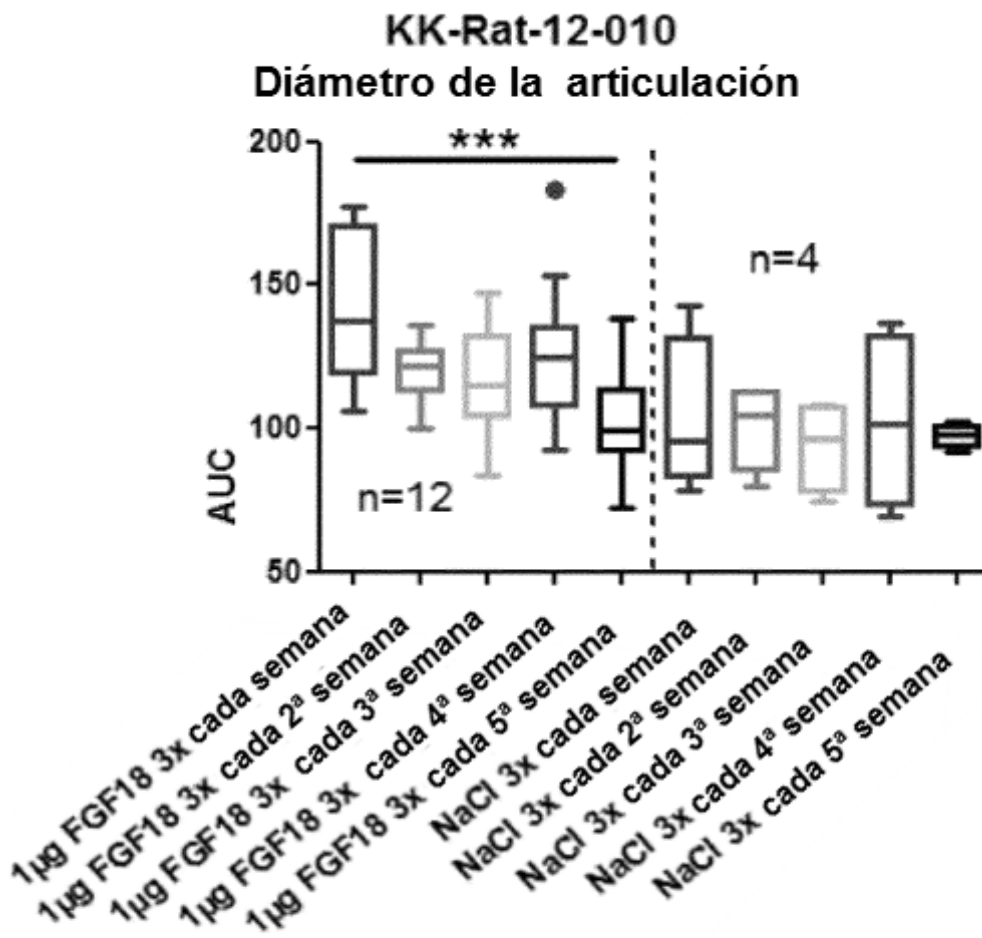
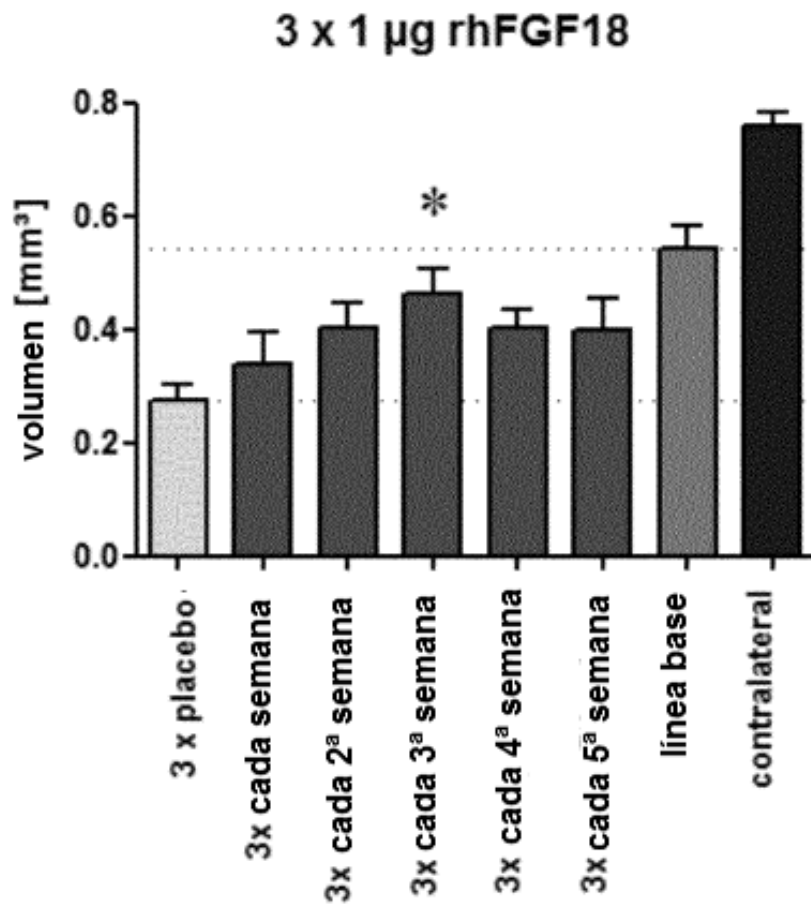


Figura 8



**\* ANOVA de 1 vía; Dunnett frente placebo**

media & SEM; N = 12-20 / grupo excepto placebo (N=20)

Figura 9