

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 759 060**

51 Int. Cl.:

A61K 38/04 (2006.01)

A61P 19/02 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **07.07.2014 PCT/EP2014/001861**

87 Fecha y número de publicación internacional: **12.02.2015 WO15018472**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **07.07.2014 E 14741803 (2)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **28.08.2019 EP 3030250**

54 Título: **Administración intraarticular de pepstatina para la artrosis**

30 Prioridad:

06.08.2013 EP 13003923

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

07.05.2020

73 Titular/es:

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

72 Inventor/es:

**KLEIN, MARKUS;
WODOPIA, RALF;
GUEHRING, HANS y
LINDEMANN, SVEN**

74 Agente/Representante:

CARVAJAL Y URQUIJO, Isabel

ES 2 759 060 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

Administración intraarticular de pepstatina para la artrosis

5 La presente invención se refiere a preparaciones farmacéuticas y medicamentos para la administración intraarticular que contienen pepstatina, así como su preparación y, en particular, su uso en el tratamiento y/o la profilaxis de artrosis, lesiones condrales traumáticas, artritis, dolor, alodinia o hiperalgesia, prefiriéndose en especial para la artrosis.

Antecedentes de la invención

10 La artrosis es la enfermedad articular más extendida a nivel mundial y se encuentran indicios radiológicos de artrosis en la mayoría de personas de más de 65 años. A pesar de esta importancia fundamental para el sistema sanitario, hasta este momento las causas de la artrosis todavía no se han aclarado y las medidas preventivas eficaces todavía continúan siendo un objetivo lejano. La reducción de la cavidad articular (debido a la destrucción del cartílago articular) junto con alteraciones de los huesos subcondrales y la formación de osteofitos son las características radiológicas de la enfermedad. Para los pacientes, no obstante, la prioridad son los dolores (dolores en reposo nocturnos y relacionados con cargas) con la subsiguiente limitación funcional. Esto es también lo que lleva a los
15 pacientes al aislamiento social con las correspondientes deuteropatías.

El concepto artrosis se refiere, según una definición no oficial en Alemania, a un «desgaste articular» que sobrepasa los niveles habituales de la edad. Se considera que las causas son un exceso de carga (peso corporal algo elevado), causas congénitas o traumáticas, como alineación incorrecta de las articulaciones, o también deformaciones óseas debidas a osteopatías como la osteoporosis. Asimismo, la artrosis puede originarse como consecuencia de otras enfermedades (artrosis secundaria), por ejemplo de una inflamación articular (artritis), o ir acompañada del desarrollo de derrames debido a sobrecargas (reacción inflamatoria secundaria) (artrosis activada). La literatura especializada angloamericana distingue entre la osteoartrosis (osteoarthritis [OA] en inglés), en la que la destrucción de las superficies articulares probablemente se debe fundamentalmente a efectos de carga, y la artritis (arthritis, rheumatoid arthritis [RA] en inglés), en la que tiene prioridad la degeneración articular debido a un componente
20 inflamatorio.

Fundamentalmente, las artrosis se diferencian según su causa. La artrosis alcaptonúrica se basa en un aumento de los depósitos de ácido homogentísico en las articulaciones en caso de la susodicha alcaptonuria. En la artrosis hemofílica se presentan con regularidad hemorragias intraarticulares en caso de hemofilia (hemartrosis). La artrosis úrica se produce por el efecto mecánico de cristales de urato (ácido úrico) en el cartílago sano (W. Pschyrembel y col.: Klinisches Wörterbuch mit klinischen Syndromen und einem Anhang Nomina Anatomica. Editorial Walter de Gruyter & Co, 253ª edición, 1977).
30

La displasia de las articulaciones representa la causa clásica de una artrosis. En el ejemplo de la cadera está claro que la zona más cargada mecánicamente en una posición fisiológica de cadera presenta una superficie claramente más grande que en el caso de una cadera displásica. Sin embargo, las cargas debidas a las fuerzas que actúan sobre la articulación son en su mayor parte independientes de la forma de la articulación. Se reparten fundamentalmente sobre la(s) zona(s) de carga principal(es). De esta manera, se produce una mayor carga por presión en una zona pequeña que en una zona más grande. Por lo tanto, en una cadera displásica la carga biomecánica por presión del cartílago articular es mayor que en una posición fisiológica de cadera. En general, se considera que este principio es la causa de la aparición frecuente de alteraciones artrósicas en las articulaciones de soporte que difieren de la forma anatómica ideal.
35 40

Si las consecuencias de una lesión son las responsables de un desgaste prematuro, se habla de una artrosis postraumática. Como otras causas de una artrosis secundaria se habla de razones mecánicas, inflamatorias, metabólicas, químicas (quinolonas), tróficas, hormonales, neurológicas y genéticas. En la mayoría de casos, sin embargo, se declara como diagnóstico una artrosis idiopática en la que el médico expresa la aparente falta de una enfermedad causal (H. I. Roach y S. Tilley, Bone and Osteoarthritis F. Bronner y M. C. Farach-Carson (editores), editorial Springer, volumen 4, 2007).
45

Las causas medicamentosas de una artrosis pueden ser, por ejemplo, antibióticos del tipo inhibidores de girasa (fluoroquinolonas, como ciprofloxacino, levofloxacino). En tejidos con una mala vascularización (cartílago articular hialino, tejidos de tendón), estos medicamentos provocan una complejación de iones magnesio, lo cual tiene como consecuencia que se producen lesiones irreversibles en el tejido conjuntivo. Normalmente estas lesiones son más marcadas en niños y jóvenes en fase de crecimiento. Las tendopatías y artropatías son efectos secundarios conocidos de esta clase de medicamentos. En adultos, según informaciones de farmacólogos y reumatólogos independientes, estos antibióticos provocan una degradación fisiológica acelerada del cartílago articular hialino (M. Menschik y col., Antimicrob. Agents Chemother. 41, 1997, págs. 2562-2565; M. Egerbacher y col., Arch. Toxicol. 73,
50

2000, págs. 557-563; H. Chang y col., *Scand. J. Infect. Dis.* 28, 1996, págs. 641-643; A. Chaslerie y col., *Therapie* 47, 1992, pág. 80). También un tratamiento prolongado con fenprocumón puede favorecer una artrosis a causa de la reducción de la densidad ósea en caso de cargas de la estructura interna de la articulación.

5 Además de la edad, se conocen como factores de riesgo de la osteoartrosis las sobrecargas mecánicas, (micro)traumatismos, desestabilizaciones de la articulación provocadas por la pérdida de mecanismos de seguridad, así como factores genéticos. Sin embargo, no se han aclarado completamente ni el origen ni las posibilidades de intervención (H. I. Roach y S. Tilley, *Bone and Osteoarthritis F. Bronner y M. C. Farach-Carson* (editores), editorial Springer, volumen 4, 2007).

10 En una articulación afectada por artrosis el contenido de monóxido de nitrógeno aumenta temporalmente. De un modo similar, podría observarse a causa de una irritación mecánica elevada del tejido condral (P. Das y col., *Journal of Orthopaedic Research* 15, 1997, págs. 87-93. A. J. Farrell y col. *Annals of the Rheumatic Diseases* 51, 1992, págs. 1219-1222; B. Fermor y col., *Journal of Orthopaedic Research* 19, 2001, págs. 729-737), mientras que una estimulación mecánica moderada repercute de una forma más bien positiva. Con ello, los efectos de fuerza mecánica intervienen como causa en el avance de la osteoartrosis (X. Liu y col., *Biorheology* 43, 2006, págs. 183-190).

15 Fundamentalmente, la terapia de la artrosis persigue dos objetivos. Por un lado, la ausencia de dolor bajo una carga habitual y, por otro lado, impedir las limitaciones mecánicas o las alteraciones de una articulación. Estos objetivos no se pueden conseguir a largo plazo mediante un tratamiento del dolor como único método terapéutico sintomático, ya que con este tratamiento no se puede impedir el avance de la enfermedad. Si se quiere conseguir esto último, se debe detener la destrucción del cartílago. Puesto que en pacientes adultos el cartílago articular no se puede regenerar, es de suma importancia, además, la eliminación de factores patogenéticos como displasias articulares o alineaciones incorrectas que provocan un aumento de cargas de presión puntuales del cartílago articular.

Finalmente, con la ayuda de medicamentos se intenta impedir o detener los procesos degenerativos en los tejidos condrales.

25 La matriz extracelular, que está compuesta en primer lugar de colágeno, proteoglucanos y agua, es fundamental para el estado funcional del cartílago articular y, con ello, para su capacidad de resistencia frente a cargas. Entre las enzimas que intervienen en la degradación de la matriz extracelular se encuentran, en particular, las metaloproteinasas, las agrecanasas y las enzimas catepsinas. Pero también otras enzimas pueden descomponer principalmente la matriz condral, como por ejemplo la plasmina, la calicreína, la elastasa de neutrófilos, la triptasa y la quimasa.

30 Las catepsinas pertenecen a la superfamilia papaína de las proteasas lisosomales. Las catepsinas participan en la proteólisis normal y en la transformación de proteínas diana y tejidos, así como en la iniciación de cascadas proteolíticas y activaciones de proenzimas. Además, participan en la expresión del CMH clase II (Baldwin (1993) *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 90: 6796-6800; Mixuochi (1994) *Immunol. Lett.*, 43: 189-193). En realidad, una expresión anómala de la catepsina puede provocar enfermedades graves. Así, se pudo comprobar una expresión aumentada de catepsina en células cancerosas, por ejemplo en cáncer de mama, de pulmón, de próstata, de glioblastoma y de cabeza y cuello, y se pudo demostrar que la catepsina está asociada con un éxito terapéutico insuficiente en cáncer de mama, de pulmón, de cabeza y cuello, así como en tumores cerebrales (Kos y col. (1998) *Oncol. Rep.*, 5: 1349-1361; Yan y col. (1998) *Biol. Chem.*, 379: 113-123; Mort y col.; (1997) *Int. J. Biochem. Cell Biol.*, 29: 715-720; Friedrick y col. (1999) *Eur. J Cancer*, 35: 138-144). Además, al parecer una expresión anómala de la catepsina está implicada en el desarrollo de enfermedades inflamatorias y no inflamatorias, como por ejemplo la artritis reumatoide y la osteoartrosis (Keyszer (1995) *Arthritis Rheum.*, 38: 976-984).

45 El mecanismo molecular de la actividad de la catepsina no se ha esclarecido completamente. Por un lado, se ha descubierto que, por ejemplo, una expresión inducida de catepsina en células B cuyo suero se extrae protege de la apoptosis y que un tratamiento de las células con oligonucleótidos antisentido de la catepsina B induce una apoptosis (Shibata y col. (1998) *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 251: 199-20; Isahara y col. (1999) *Neuroscience*, 91: 233-249). Estos estudios sugieren un papel antiapoptótico de las catepsinas. Sin embargo, se encuentran en oposición total respecto a estudios previos que describen las catepsinas como mediadoras de la apoptosis (Roberts y col. (1997) *Gastroenterology*, 113: 1714-1726; Jones y col. (1998) *Am. J. Physiol.*, 275: G723-730).

50 Las catepsinas se sintetizan como zimógenos inactivos en los ribosomas y se transfieren al sistema lisosomal. Tras la disociación proteolítica del propéptido N terminal aumenta la concentración de catepsina en el medio ácido de los lisosomas hasta 1 mM y los lisosomas liberan las catepsinas hacia el medio extracelular.

Entre las catepsinas se distinguen las cisteína catepsinas B, C, H, F, K, L, O, S, V y W, las aspartil catepsinas D y E y la serina catepsina G.

Ejemplos de inhibidores de catepsina en el desarrollo clínico son inhibidores de catepsina K para el tratamiento de la artrosis e inhibidores de catepsina S para el tratamiento de la artritis, el dolor neuropático y la psoriasis.

Entre las aspartil proteasas también se encuentran, además de la catepsina D, la aspartil proteasa VIH (proteasa VIH-1), la renina, la pepsina A y C, BACE (Asp2, memapsina), la plasmepsina y las aspartil hemoglobinasas (Takahashi, T. y col., Ed. Aspartic Proteinases Structure, Function, Biology and Biomedical Implications (Plenum Press, New York, 1995), Adams, J. y col., Ann. Rep. Med. Chem. 31, 279-288, 1996; Edmunds J. y col., Ann. Rep. Med. Chem. 31, 51-60, 1996; Miller, D. K. y col., Ann. Rep. Med. Chem 31, 249-268, 1996). La catepsina D participa normalmente en la degradación de proteínas intracelulares o fagocitadas y por ello desempeña un papel importante en el metabolismo proteico (Helseth, y col., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 81, 3302-3306, 1984), en el catabolismo proteico (Kay, y col., Intracellular Protein Catabolism (eds. Katunuma, y col., 155-162, 1989) y en el procesamiento de antígenos (Guagliardi, y col., Nature, 343, 133-139, 1990; Van Noort, y col., J. Biol. Chem., 264, 14159-14164, 1989).

Los niveles elevados de catepsina D se han relacionado con una serie de enfermedades. Así, los niveles elevados de catepsina D están en correlación con pronósticos malos en caso de cáncer de mama y con invasión celular elevada y mayor riesgo de metástasis, así como con un tiempo de supervivencia menor sin recidivas tras la terapia y una tasa de supervivencia más reducida en conjunto (Westley B. R. y col., Eur. J. Cancer 32, 15-24, 1996; Rochefort, H., Semin. Cancer Biol. 1:153, 1990; Tandon, A. K. y col., N. Engl. J. Med. 322, 297, 1990). La tasa de secreción de catepsina D en caso de cáncer de mama se obtiene a través de una sobreexpresión del gen y a través de un procesamiento modificado de la proteína. Unos niveles elevados de catepsina D y de otras proteasas, como por ejemplo colagenasa, fabricada en las inmediaciones de un tumor en crecimiento, podrían incluso degradar la matriz extracelular alrededor del tumor y así provocar el desdormimiento de células tumorales y la invasión de nuevos tejidos a través del sistema linfático y sanguíneo (Liotta L. A., Scientific American Feb:54, 1992; Liotta L. A. y Stetler-Stevenson W. G., Cancer Biol. 1:99, 1990; Liaudet E., Cell Growth Differ. 6:1045-1052, 1995; Ross J. S., Am. J. Clin. Pathol. 104:36-41, 1995; Dickinson A. J., J. Urol. 154:237-241, 1995).

Además, la catepsina D está relacionada con alteraciones degenerativas del cerebro, como por ejemplo la enfermedad de Alzheimer. Así, la catepsina D está asociada con la descomposición del precursor de la proteína β -amiloide o de un precursor mutante que aumenta la expresión de la proteína amiloide en las células transfectadas (Cataldo, A. M. y col., Proc. Natl. Acad. Sci. 87: 3861, 1990; Ladrór, U. S. y col., J. Biol. Chem. 269: 18422, 1994; Evin G., Biochemistry 34: 14185-14192, 1995). La proteína β -amiloide, que resulta de la proteólisis del precursor de la proteína β -amiloide, provoca la formación de placas en el cerebro y parece ser la responsable del desarrollo de la enfermedad de Alzheimer. También se han encontrado niveles elevados de catepsina D en el líquido cefalorraquídeo de pacientes de alzhéimer y se pudo demostrar una elevada actividad proteolítica de la catepsina D frente al precursor mutante de la proteína β -amiloide (Schwager, A. L., y col. J. Neurochem. 64:443, 1995). Además, se mide un aumento significativo de la actividad de la catepsina D en biopsias de pacientes con la enfermedad de Huntington (Mantle D., J. Neurol. Sci. 131: 65-70, 1995).

En la manifestación de una artrosis, la catepsina D probablemente desempeña un papel fundamental en varios niveles. Así, se miden niveles más elevados de ARNm de catepsina D en perros con artrosis espontánea en comparación con perros sanos en el cartílago articular del cóndilo de cadera (Clements D. N. y col., Arthritis Res. Ther. 2006; 8(6): R158; Ritchlin C. y col., Scand. J. Immunol. 40: 292-298, 1994). También Devauchelle V. y col. (Genes Immun. 2004, 5(8): 597-608) muestran tasas de expresión diferentes de catepsina D en pacientes humanos en caso de artrosis en comparación con la artritis reumatoide (véase también Keyszer G. M., Arthritis Rheum. 38: 976-984, 1995). La catepsina D también parece estar implicada en caso de mucopolipidosis (Kopitz J., Biochem. J. 295, 2: 577-580, 1993).

La endopeptidasa lisosomal catepsina D es la proteinasa más extendida en los condrocitos (Ruiz-Romero C. y col., Proteomics. 2005, 5(12): 3048-59). La actividad proteolítica de la catepsina D se ha demostrado además en líquidos sinoviales cultivados de pacientes con osteoartritis (Bo G. P. y col., Clin. Rheumatol. 2009, 28(2): 191-9) y también en tejidos de sinovectomía de pacientes con artritis reumatoide se encuentra una elevada actividad proteolítica (Taubert H. y col., Autoimmunity. 2002, 35(3): 221-4). Lorenz y col. (Proteomics. 2003, 3(6): 991-1002) también escriben que todavía no se ha estudiado con detalle la aspartil proteasa catepsina D lisosomal y secretada en contraste con las catepsinas B y L con respecto a la artritis y artrosis, sin embargo, Lorenz y col. han encontrado niveles proteicos más elevados de catepsina D en tejidos sinoviales de pacientes con artrosis en comparación con pacientes con artritis reumatoide.

Gedikoglu y col. (Ann. Rheum. Dis. 1986, 45(4): 289-92) han podido demostrar igualmente una actividad proteolítica elevada de catepsina D en tejidos sinoviales y Byliss y Ali (Biochem. J. 1978, 171(1): 149-54) en el cartílago de pacientes con artrosis.

En la artrosis se produce una reducción local del valor de pH en las zonas del cartílago. Esta reducción del valor de pH tiene una importancia crucial para entender los procesos catabólicos del cartílago.

5 En la artrosis también se encuentra una correlación directa del valor de pH reducido en el tejido articular y la gravedad y la evolución de la enfermedad. A un valor de pH de 5,5 se produce una autodigestión del cartílago. Esto se puede inhibir casi completamente en cultivos de explantes (por ejemplo, de ratón, bóvido o humano) mediante pepstatina o ritonavir. Esto sugiere un papel fundamental, si no incluso un papel clave, de la catepsina D en la artrosis, ya que la pepstatina inhibe las aspartil proteasas con una excepción – BACE1 – y hasta ahora solo se han identificado estas dos aspartil proteasas en los tejidos condrales. Así, Bo G. P. y col. (Clin. Rheumatol. 2009, 28(2): 191-9) también describen el importante papel de la catepsina D en las alteraciones patológicas de las articulaciones.

10 El inhibidor de aspartil proteasas más conocido es la pepstatina, un péptido que se aisló originalmente de un cultivo de *Streptomyces*. La pepstatina es eficaz frente a pepsina, catepsina y renina. Por eso, muchos inhibidores de aspartil proteasas se han basado en el modelo de la estructura de la pepstatina (patente de EE. UU. n.º 4,746,648; Umezawa, H., y col., J. Antibiot (Tokio) 23: 259-62, 1970; Morishima, H., y col., J. Antibiot. (Tokio) 23: 263-5, 1970; Lin, T. y Williams, H. R., J. Biol. Chem. 254: 11875-83, 1979; Jupp, R. A., y col., Biochem. J. 265: 871-8, 1990; Agarwal, N. S. y Rich, D. H., J. Med. Chem. 29: 2519-24, 1986; Baldwin, E. T., y col., Proc. Natl. Acad. Sci., EE. UU. 90: 6796-800, 1993; Francis, S. E. y col., EMBO J 13: 306-17, 1994).

20 Las aspartil proteasas o la catepsina D se describen con frecuencia como proteínas diana de principios activos para el tratamiento de enfermedades neurodegenerativas, trastornos cognitivos, demencia, alzhéimer, cáncer, malaria, infección por VIH y enfermedades del sistema cardiocirculatorio y vascular y se revelan inhibidores de aspartil proteasas o catepsina D para el tratamiento de estas enfermedades, por ejemplo, en los documentos WO 2009013293, EP 1987834, EP 1872780, EP 1867329, EP 1745778, EP 1745777, EP 1745776, WO 1999002153, WO 1999055687, US 6150416, WO 2003106405, WO 2005087751, WO 2005087215, WO 2005016876, US 2006281729, WO 2008119772, WO 2006074950, WO 2007077004, WO 2005049585, US 6251928 y US 6150416.

25 El documento WO 2012107153 da a conocer compuestos peptídicos, así como también pepstatina, como antagonistas de la catepsina D que se pueden emplear para el tratamiento de la artrosis y se pueden administrar por vía intraarticular para ello.

30 Los inhibidores de catepsina D conocidos y los dos compuestos modelo pepstatina y ritonavir inhiben con eficacia la actividad de la catepsina D, sin embargo presentan una selectividad muy reducida frente a otras aspartil proteasas. El papel del sistema renina-angiotensina (RAS, por sus siglas en inglés) en la regulación de la tensión arterial y del contenido de líquido y electrolitos (Oparil, S. y col., N. Engl. J. Med. 1974; 291: 381-401/446-57) y la eficacia de los inhibidores de renina y pepsina en enfermedades del sistema cardiocirculatorio y vascular son suficientemente conocidos y, por tanto, en particular en la administración oral o sistémica de estos inhibidores poco selectivos de catepsina D se debe contar con numerosos efectos secundarios y también en la administración local se debe contar con complicaciones sistémicas debido a la difusión esperada de los compuestos en la sangre.

35 Además, precisamente los compuestos peptídicos presentan por lo general una estabilidad baja en el plasma, el líquido sinovial y líquidos de otros compartimentos y el metabolismo los degrada muy rápidamente de modo que se espera un tiempo de permanencia reducido en la sangre, en la cápsula articular y en otros compartimentos.

40 Powell, M. F. y col. (J. Pharm. Sciences, vol. 81, n.º 8, 731-735, 1992) investigaron la estabilidad de compuestos peptídicos en suero humano unificado (mezcla) y en líquido sinovial unificado (mezcla) de pacientes con artritis reumatoide (véase la pág. 731, columna derecha, penúltimo párrafo). En las Tablas 1 y 2, Powell y col., revelaron que la mayoría de los péptidos de ensayo modificados y no modificados con una longitud de 10 a 25 aminoácidos presentan una semivida inferior a una hora en los medios de ensayo, plasma humano (HS, por sus siglas en inglés), líquido sinovial (SF, por sus siglas en inglés), suero de ternera fetal (FCS, por sus siglas en inglés) u homogeneizado de hígado de ratón (MLH, por sus siglas en inglés) (véase la página 735, columna derecha, último párrafo). La estabilidad de los compuestos peptídicos en el suero humano unificado y en el líquido sinovial unificado de pacientes con artritis es básicamente igual de baja (véase la página 733).

50 En vista de la baja estabilidad y el reducido tiempo de permanencia de los compuestos peptídicos en el plasma y debido a los efectos secundarios esperados descritos anteriormente, una administración sistémica u oral de los inhibidores peptídicos de catepsina D para el tratamiento de la artrosis no entra en consideración.

Por lo general, los especialistas tampoco tienen en cuenta una administración intraarticular de los compuestos peptídicos debido a la reducida semivida esperada en el líquido sinovial, y especialmente debido al reducido tiempo de permanencia esperado en la cápsula articular (difusión mediante la membrana sinovial y degradación) y debido a los efectos secundarios sistémicos que se pueden esperar debido a la difusión al plasma.

Debido sobre todo a la reducida semivida de unas pocas horas de los compuestos peptídicos según Powell y col. (1992), se necesitarían inyecciones intraarticulares frecuentes. No obstante, las inyecciones en la cavidad articular están vinculadas a dolores y a un riesgo de infección considerable para los pacientes y, por consiguiente, dichas inyecciones no se deben realizar con una frecuencia superior a un intervalo de entre dos y cuatro semanas.

5 Por tanto, el objetivo de la presente invención fue encontrar nuevos medicamentos y preparaciones farmacéuticas que se puedan emplear para la prevención y el tratamiento de la artrosis y que sean lo suficientemente estables para la administración local o intraarticular en el líquido sinovial y que solo tengan una difusión reducida al plasma a través de la membrana sinovial y que, por consiguiente, presenten un tiempo de permanencia elevado en la cápsula articular de modo que la concentración del principio activo se mantenga en un intervalo terapéuticamente eficaz durante el mayor tiempo posible tras la inyección.

Resumen de la invención

Sorprendentemente, pese a su elevado aclaramiento en la administración intravenosa u oral, se ha descubierto que la pepstatina permanece en la cápsula articular o el líquido sinovial con una concentración considerablemente superior a CI_{50} y, por tanto, con una concentración farmacéuticamente eficaz en caso de inyección intraarticular de una suspensión durante un periodo de tiempo prolongado. Además, pese a su estructura peptídica, la pepstatina muestra una estabilidad sorprendentemente elevada en el líquido sinovial (véase el ejemplo) y, con ello, la pepstatina supera considerablemente incluso las máximas estabilidades de compuestos peptídicos medidas por Powell y col. en el líquido sinovial (véase Powell y col., Tabla II en la página 733: n.º 8 toxina pertussis con una semivida de casi dos días en el líquido sinovial, n.º 15 Myobacterium leprae con una semivida de unas siete horas y media, todos los demás compuestos peptídicos con semividas de unos pocos minutos) y precisamente esta estabilidad sorprendentemente elevada y el tiempo de permanencia sorprendentemente alto en la cápsula articular permiten una aplicación médica relevante de la pepstatina en el tratamiento de la artrosis, ya que la pepstatina no permanece en la cápsula articular solamente unas pocas horas con niveles clínicamente relevantes, como cabría esperar según Powell y col., sino que está presente con una concentración considerablemente superior a CI_{50} durante más de dos semanas.

De esta forma, la pepstatina es sorprendentemente adecuada para medicamentos y preparaciones farmacéuticas que se administran de forma local o intraarticular para la prevención o el tratamiento de la artrosis y que mantienen niveles elevados durante un periodo de tiempo prolongado, de modo que el medicamento y las preparaciones farmacéuticas según la invención se deben administrar intraarticularmente como máximo de forma semanal, preferentemente en intervalos de uno a varios meses.

La pepstatina inhibe la catepsina D con una elevada eficacia y se esperan pocos efectos secundarios en la administración intraarticular para el tratamiento de la artrosis, puesto que la pepstatina en administración intraarticular alcanza solamente un bajo nivel sistémico (nivel plasmático) debido a su elevado tiempo de permanencia en la cápsula articular y a su lenta liberación desde el líquido sinovial.

35 En particular, el elevado tiempo de permanencia de la pepstatina en la cápsula articular es sorprendente y terapéuticamente valioso, ya que, por ejemplo, a partir de las investigaciones de Powell y col. (1992) cabría esperar una baja estabilidad de los compuestos peptídicos en el líquido sinovial y habría que contar con una elevada liberación de compuestos peptídicos de pequeño tamaño desde el líquido sinovial al plasma. Estos dos procesos causarían un bajo tiempo de permanencia en la cápsula articular. No obstante, sorprendentemente la pepstatina cuenta con un tiempo de permanencia prolongado en la cápsula articular, pese a lo esperado, ya que su estabilidad en el líquido sinovial es elevada y la liberación desde el líquido sinovial aparentemente es muy baja.

La pepstatina contiene varios centros quirales, de modo que también es objeto de la invención el uso de las formas ópticamente activas (estereoisómeros), los enantiómeros, los racematos, los diastereómeros así como los hidratos y los solvatos de pepstatina.

45 Se entenderá por derivados farmacéutica o fisiológicamente compatibles, por ejemplo, las sales de pepstatina, así como los compuestos llamados profármacos. Se entenderá por profármacos derivados de pepstatina modificados, por ejemplo, con grupos alquilo o acilo (véanse también los grupos protectores de amino e hidroxilo a continuación), azúcares u oligopéptidos que en el organismo se disocian o se liberan rápidamente para dar las moléculas de pepstatina eficaces. Entre estos se encuentran también los derivados poliméricos biodegradables de pepstatina, como se describe, por ejemplo, en Int. J. Pharm. 115 (1995), 61-67.

50 La pepstatina se puede usar en su forma no salina definitiva. Por otro lado, la presente invención abarca también el empleo de pepstatina en forma de sus sales farmacéuticamente aceptables, que pueden derivarse de diversas bases orgánicas e inorgánicas según las formas de proceder conocidas en el sector. Las formas de sales farmacéuticamente aceptables de la pepstatina se elaboran en su mayor parte de forma convencional. Dado que la

pepstatina contiene un grupo de ácido carboxílico, podrá formarse una de sus sales adecuadas mediante la reacción de la pepstatina con una base adecuada para dar la correspondiente sal de adición de base. Tales bases son, por ejemplo, los hidróxidos de los metales alcalinos, entre los cuales se encuentran el hidróxido de potasio, el hidróxido de sodio y el hidróxido de litio; los hidróxidos de los metales alcalinotérreos tales como el hidróxido de bario y el hidróxido de calcio; los alcoholatos de los metales alcalinos, por ejemplo el metanolato de potasio y el propanolato de sodio; así como diversas bases orgánicas tales como la piperidina, la dietanolamina y la N-metilglutamina. Las sales de aluminio de la pepstatina pertenecen igualmente a este grupo.

De igual modo, a las sales con bases de pepstatina pertenecen las sales de aluminio, de amonio, de calcio, de cobre, férricas(III), ferrosas(II), de litio, de magnesio, mangánicas(III), manganosas(II), de potasio, de sodio y de cinc, lo cual no debe representar ningún tipo de limitación.

Entre las sales anteriormente citadas se prefieren el amonio; las sales de metales alcalinos de sodio y de potasio, así como las sales de metales alcalinotérreos de calcio y de magnesio. Entre las sales de pepstatina que se derivan de las bases no tóxicas orgánicas farmacéuticamente aceptables se encuentran las sales de aminas primarias, secundarias y terciarias, aminas substituidas, entre las cuales se encuentran también las aminas substituidas de origen natural, las aminas cíclicas así como las resinas intercambiadoras de iones básicas, por ejemplo la arginina, la betaína, la cafeína, la cloroprocaína, la colina, la N,N'-dibenciletilendiamina (benzatina), la diciclohexilamina, la dietanolamina, la dietilamina, el 2-dietilaminoetanol, el 2-dimetilaminoetanol, la etanolamina, la etilendiamina, la N-etilmorfolina, la N-etilpiperidina, la glucamina, la glucosamina, la histidina, la hidrabamina, la iso-propilamina, la lidocaína, la lisina, la meglumina, la N-metil-D-glucamina, la morfolina, la piperazina, la piperidina, las resinas poliamínicas, la procaína, la purina, la teobromina, la trietanolamina, la trietilamina, la trimetilamina, la tripropilamina así como la tris-(hidroximetil)-metilamina (trometamina), lo cual no debe representar ningún tipo de limitación.

Tal como se ha mencionado, se forman las sales de adición de base de pepstatina farmacéuticamente aceptables con metales o con aminas tales como los metales alcalinos y los metales alcalinotérreos o con las aminas orgánicas. Los metales preferentes son el sodio, el potasio, el magnesio y el calcio. Las aminas orgánicas preferentes son la N,N'-dibenciletilendiamina, la cloroprocaína, la colina, la dietanolamina, la etilendiamina, la N-metil-D-glucamina y la procaína.

Las sales de adición de base de pepstatina se preparan poniéndose en contacto la forma de ácido libre con una cantidad suficiente de la base deseada, con lo cual se forma la sal de manera usual. Puede regenerarse el ácido libre poniendo en contacto la forma salina con un ácido y aislando el ácido libre de manera usual. Las formas de ácido libre se diferencian en cierto sentido de sus formas salinas correspondientes en lo que se refiere a determinadas propiedades físicas, tal como la solubilidad en disolventes polares; en el ámbito de la invención las sales corresponden, sin embargo, por lo demás a sus correspondientes formas de ácido libre.

En lo que se refiere a lo que se ha dicho anteriormente, se observa que debe entenderse por el concepto de «sal farmacéuticamente aceptable» en el presente contexto un producto activo que contenga pepstatina en forma de una de sus sales, especialmente cuando esta forma salina proporcione propiedades farmacocinéticas mejoradas al producto activo en comparación con la forma libre del producto activo o en comparación con cualquier otra forma salina del producto activo que hubiera sido empleada con anterioridad. La forma salina farmacéuticamente aceptable del principio activo podrá proporcionar a este principio activo por primera vez una propiedad farmacocinética deseada, de la cual no disponía anteriormente, e incluso puede influenciar positivamente en el cuerpo sobre la farmacodinámica de este principio activo en lo que se refiere a su actividad terapéutica.

Se entenderá por solvatos de pepstatina los compuestos de adición de moléculas inertes de disolventes de pepstatina que se formen debido a su fuerza de atracción mutua. Los solvatos son, por ejemplo, hidratos, como monohidratos o dihidratos, o alcoholatos, es decir, compuestos de adición con alcoholes como, por ejemplo, metanol o etanol.

Se ha descubierto que la pepstatina se tolera bien y posee propiedades farmacológicas valiosas ya que inhibe selectivamente las aspartil proteasas y, en particular, la catepsina D.

Como estados fisiológicos y/o patofisiológicos se entiende estados fisiológicos y/o patofisiológicos que son médicamente relevantes como, por ejemplo, enfermedades o afecciones, disfunciones, dolencias, síntomas o complicaciones médicos y similares, en particular enfermedades.

El dolor es una percepción sensorial compleja que como fenómeno agudo muestra el carácter de una señal de alarma y orientación, pero como dolor crónico ha perdido este carácter y en este caso (como Síndrome del dolor crónico) hoy en día debe considerarse y debe tratarse como un cuadro clínico independiente. En medicina, se denomina hiperalgesia a una sensibilidad y reacción excesivas al dolor en relación a un estímulo generalmente doloroso. Los estímulos que pueden provocar los dolores son, por ejemplo, la presión, el calor, el frío o las

inflamaciones. La hiperalgesia es una forma de hiperestesia, término genérico para una sensibilidad excesiva en relación a un estímulo. En medicina, se denomina alodinia a una sensación de dolor producida por un estímulo que generalmente no provoca dolor.

5 La pepstatina presenta una actividad biológica ventajosa que puede demostrarse fácilmente en ensayos enzimáticos y experimentos con animales, como se describe en los ejemplos. En este tipo de ensayos basados en enzimas, la pepstatina muestra y provoca un efecto inhibitorio que se documenta usualmente por medio de los valores CI_{50} en un intervalo adecuado, preferentemente en el intervalo micromolar y más preferentemente en el intervalo nanomolar.

10 La pepstatina puede administrarse a humanos o animales, en particular mamíferos tales como monos, caballos, perros, gatos, ratas o ratones, y se puede utilizar en el tratamiento terapéutico del cuerpo humano o del cuerpo animal así como en la lucha contra las enfermedades citadas anteriormente. También puede utilizarse como agente de diagnóstico o como reactivo.

15 La pepstatina se puede emplear para la elaboración de preparaciones farmacéuticas para la administración intraarticular, en particular de un modo no químico. Para ello, se mezcla con al menos un vehículo o excipiente sólido, líquido y/o semilíquido y, dado el caso, se combina con uno o varios principio(s) activo(s) adicional(es) en una forma de dosificación adecuada.

20 Las preparaciones farmacéuticas según la invención pueden utilizarse en forma de medicamentos en medicina humana o veterinaria. El paciente o receptor puede pertenecer a cualquier especie de mamífero, por ejemplo, una especie de primate, en especial humanos; roedores, incluidos ratones, ratas y hámsteres; conejos, caballos, bóvidos, perros, gatos, etc. Los modelos animales son de interés para estudios experimentales en los que ofrecen un modelo para el tratamiento de una enfermedad humana.

25 Se tienen en consideración como vehículos sustancias orgánicas o inorgánicas que son apropiadas para la administración intraarticular y que no reaccionan con los compuestos según la invención. Los excipientes adecuados para la formulación farmacéutica deseada son conocidos por el especialista gracias a sus conocimientos especializados. Además de disolventes como agua, solución salina fisiológica o alcoholes como, por ejemplo, etanol, propanol o glicerina, soluciones de azúcares como glucosa o soluciones de manitol o una mezcla de los disolventes mencionados y otros vehículos para el principio activo, pueden utilizarse estabilizadores y/o agentes reticulantes, emulsionantes, sales para modificar la presión osmótica, antioxidantes, dispersantes, antiespumantes, tampones, conservantes o solubilizantes. Si se desea, las preparaciones o medicamentos según la invención pueden contener uno o varios principios activos, por ejemplo una o varias vitaminas o principios activos que sean eficaces para la profilaxis y/o el tratamiento de las indicaciones médicas mencionadas anteriormente.

30 Si se desea, las preparaciones o medicamentos según la invención pueden contener uno o varios principios activos adicionales y/o uno o varios adyuvantes.

Los términos «formulación farmacéutica» y «preparación farmacéutica» se utilizan como sinónimos en el marco de la presente invención.

35 En el presente documento «farmacéuticamente compatible» se refiere a medicamentos, reactivos de precipitación, vehículos, excipientes, estabilizantes, disolventes y otros agentes que permiten la administración de las preparaciones farmacéuticas obtenidas de ellos sin efectos secundarios fisiológicos no deseados en mamíferos.

40 En el caso de preparaciones farmacéuticas para la administración parenteral se exige que sean isotónicas y euhídricas, así como que la formulación, los excipientes utilizados y el material de envasado primario sean tolerables y seguros (baja toxicidad). Sorprendentemente, la pepstatina tiene preferentemente la ventaja de que es posible un uso directo y de que antes del uso en formulaciones farmacéuticas no es necesaria ninguna otra etapa de purificación para eliminar agentes peligrosos desde un punto de vista toxicológico como, por ejemplo, elevadas concentraciones de disolvente orgánico u otros excipientes peligrosos desde un punto de vista toxicológico.

45 Las preparaciones farmacéuticas según la invención para la administración intraarticular pueden contener pepstatina en forma precipitada no cristalina, precipitada cristalina o en disolución o en suspensión, así como, dado el caso, vehículos y/o excipientes y/o principios activos farmacéuticos adicionales.

50 Preferentemente, la pepstatina permite elaborar formulaciones con concentraciones elevadas sin que se produzcan agregaciones desfavorables no deseadas de pepstatina. Así, se pueden elaborar soluciones listas para su aplicación con una elevada proporción de principio activo con ayuda de pepstatina con disolventes acuosos o en medios acuosos.

La pepstatina y/o sus sales y solvatos fisiológicamente compatibles también pueden liofilizarse y los liofilizados obtenidos pueden utilizarse, por ejemplo, para la elaboración de preparados para inyección para la administración intraarticular.

5 Se pueden elaborar preparaciones acuosas para la administración intraarticular disolviendo o suspendiendo la pepstatina en una solución acuosa y, dado el caso, añadiendo excipientes. Para ello, resulta apropiado añadir a una solución o suspensión con una concentración definida de pepstatina volúmenes definidos de solución madre que contiene los excipientes adicionales mencionados en una concentración definida y, dado el caso, diluirla con agua hasta la concentración previamente calculada. Como alternativa, se pueden añadir los excipientes en forma sólida. A
10 continuación, a la solución o suspensión acuosa obtenida se pueden añadir las cantidades necesarias correspondientes de solución madre y/o agua. También resulta apropiado poder disolver o suspender la pepstatina directamente en una solución que contiene todos los demás excipientes.

De un modo ventajoso, las soluciones o suspensiones que contienen pepstatina se elaboran con un valor de pH de 4 a 10, preferentemente con un valor de pH de 5 a 9, y una osmolalidad de 250 a 350 mOsmol/kg. Por consiguiente, la preparación farmacéutica puede administrarse mayoritariamente sin dolor directamente por vía intraarticular.
15 Además, a la preparación para la administración intraarticular también pueden añadirse soluciones de infusión como, por ejemplo, solución de glucosa, solución salina isotónica o solución de Ringer, que pueden contener principios activos adicionales de modo que se pueden administrar mayores cantidades de principio activo.

La pepstatina se tolera bien fisiológicamente, es fácil de elaborar, se puede dosificar con exactitud y, preferentemente, es estable en cuanto al contenido, los productos de descomposición y los agregados a lo largo del almacenamiento y del transporte y en caso de múltiples procesos de congelación y descongelación. Se puede
20 conservar de forma estable preferentemente a lo largo de un periodo de al menos tres meses hasta dos años a temperatura de frigorífico (2-8 °C) y a temperatura ambiente (23-27 °C) y con una humedad relativa (H.r.) del 60 %.

A modo de ejemplo, la pepstatina puede conservarse de forma estable mediante secado y cuando se necesita, transferirse a una preparación farmacéutica lista para usar mediante disolución o suspensión. Son métodos posibles
25 para el secado, por ejemplo, sin quedar limitados a estos ejemplos, secado con nitrógeno gas, secado en un horno de vacío, liofilización, lavado con disolvente orgánico y posterior secado al aire, secado en lecho fluido, secado en lecho fluidizado, secado por atomización, secado en tambor, secado a capas; secado al aire a temperatura ambiente y otros métodos.

El concepto «cantidad activa» significa la cantidad de un medicamento o de un principio activo farmacéutico que
30 provoca una respuesta biológica o medicinal en un tejido, en un sistema, en un animal o en un ser humano, que sea buscada o pretendida, por ejemplo, por el investigador o por el médico.

Además, el concepto «cantidad terapéuticamente activa» significa una cantidad que, en comparación con un sujeto correspondiente que no ha recibido esta cantidad, tiene como consecuencia lo siguiente: un tratamiento mejorado, la curación, la prevención o supresión de una enfermedad, de un cuadro clínico, de un estado clínico, de un padecimiento, de una disfunción o evitar efectos secundarios o también la disminución del avance de una enfermedad, de un padecimiento o de una disfunción. El concepto de «cantidad terapéuticamente activa» abarca
35 también aquellas cantidades que son eficaces para aumentar la función fisiológica normal.

Al usar preparaciones o medicamentos según la invención para la administración intraarticular, por lo general se usa pepstatina y/o sus sales y solvatos fisiológicamente compatibles de forma análoga a preparaciones o preparados
40 conocidos y comerciales. La dosificación depende de la edad, el peso, el estado de salud y la constitución del paciente, así como de la gravedad de la enfermedad y de otros factores individuales.

Las preparaciones farmacéuticas según la invención para la administración intraarticular se administran de forma intraarticular preferentemente con una frecuencia entre semanal y anual, prefiriéndose en especial entre cada 14 días y semestralmente, muy en especial, desde mensualmente hasta trimestralmente.

45 Por tanto, es objeto de la presente invención una preparación farmacéutica que contenga pepstatina y/o una de sus sales, solvatos y estereoisómeros fisiológicamente compatibles, incluidas sus mezclas en todas las proporciones, y otros vehículos y/o excipientes, para su uso como medicamento en el tratamiento y/o la profilaxis de estados fisiológicos y/o patofisiológicos seleccionados del grupo compuesto por artrosis, lesiones condrales traumáticas, artritis, dolor, alodinia o hiperalgesia, en los que la preparación farmacéutica se administra por vía intraarticular de la siguiente manera:
50

- a) desde semanalmente hasta anualmente,
- b) desde cada 14 días hasta semestralmente o
- c) desde mensualmente hasta trimestralmente.

También es un objeto preferido de la presente invención una preparación farmacéutica citada anteriormente, la cual contenga al menos otro principio activo farmacéutico.

Un objeto especialmente preferido de la presente invención es una preparación farmacéutica citada anteriormente para su uso como medicamento en el tratamiento y/o la profilaxis de la artrosis.

5 Otro objeto de la presente invención es la pepstatina y/o una de sus sales, solvatos y estereoisómeros fisiológicamente compatibles, incluidas sus mezclas en todas las proporciones, para su uso como medicamento en el tratamiento y/o la profilaxis de estados fisiológicos y/o patofisiológicos seleccionados del grupo compuesto por artrosis, lesiones condrales traumáticas, artritis, dolor, alodinia e hiperalgesia, en los que la pepstatina y/o una de sus sales, solvatos y estereoisómeros fisiológicamente compatibles, incluidas sus mezclas en todas las proporciones, se administra intraarticularmente de la siguiente manera:

- a) desde semanalmente hasta anualmente,
- b) desde cada 14 días hasta semestralmente o
- c) desde mensualmente hasta trimestralmente.

15 Es un objeto preferido de la invención la pepstatina citada anteriormente y/o sus sales, solvatos y estereoisómeros fisiológicamente compatibles, incluidas sus mezclas en todas las proporciones, para su uso como medicamento en el tratamiento y/o la profilaxis de la artrosis.

Sin embargo, la dosificación individual y los intervalos de administración para un paciente también dependen de un gran número de factores individuales como, por ejemplo, la eficacia del correspondiente compuesto utilizado, la edad, el peso corporal, el estado de salud general, el sexo, la alimentación, del momento y vía de administración, de la velocidad de excreción, de la combinación con otros medicamentos y de la gravedad y duración de la correspondiente enfermedad.

25 Una medida de la absorción de un principio activo farmacéutico en un organismo es su biodisponibilidad. Si el principio activo farmacéutico se suministra por vía intraarticular al organismo en forma de una solución para inyección, su biodisponibilidad absoluta, es decir, la proporción del fármaco que llega inalterado a la cavidad articular es del 100 %. Se pueden obtener datos respecto a la farmacocinética, es decir respecto a la biodisponibilidad, de forma análoga al método de J. Shaffer y col. (J. Pharm. Sciences, 88 (1999), 313-318).

De igual modo, pueden prepararse tales medicamentos con un procedimiento conocido en general en el sector farmacéutico.

30 Los medicamentos se pueden adaptar para la administración por vía intraarticular. Tales medicamentos pueden prepararse según todos los procedimientos conocidos en el sector farmacéutico, combinándose, por ejemplo, el principio activo con el o con los vehículos o con el o con los excipientes.

35 La administración intraarticular tiene la ventaja de que el compuesto según la invención se administra directamente cerca del cartílago articular en el líquido sinovial y desde ahí también puede difundirse hacia el tejido condral. Por lo tanto, las preparaciones farmacéuticas según la invención también pueden inyectarse directamente en la cavidad articular y así desarrollan su efecto directamente en el sitio objetivo previsto. El compuesto según la invención también es adecuado para la elaboración de medicamentos para la administración intraarticular con liberación del principio activo controlada, sostenida y/o retardada (slow-release, sustained-release, controlled release). Por lo tanto, la pepstatina también es adecuada para la elaboración de formulaciones depot, que son ventajosas para los pacientes, ya que es necesaria una aplicación solo a grandes intervalos de tiempo.

40 A los medicamentos adaptados para la administración intraarticular pertenecen las soluciones para inyección estériles acuosas y no acuosas que contengan antioxidantes, tampones, bacteriostáticos y solutos mediante los cuales la formulación se vuelve isotónica con el líquido sinovial del receptor que debe ser tratado; así como las suspensiones estériles acuosas y no acuosas que pueden contener agentes de suspensión y espesantes. Las formulaciones pueden suministrarse en recipientes que contengan una dosis individual o que contengan dosis múltiples, por ejemplo, ampollas y viales sellados, y pueden conservarse en estado secado por congelación (liofilizado) de tal manera que únicamente se requiera la adición de vehículos líquidos estériles, por ejemplo, agua para inyectables, justo antes de su utilización. Pueden prepararse las soluciones para inyección y las suspensiones, preparadas de acuerdo con una receta, a partir de polvos estériles, de granulados y de tabletas.

50 La pepstatina puede administrarse también en forma de sistemas de aporte en liposomas, tales como, por ejemplo, vesículas unilamelares pequeñas, vesículas unilamelares grandes y vesículas multilamelares. Los liposomas pueden formarse a partir de diversos fosfolípidos, tales como, por ejemplo, la colesteroína, la estearilamina o las fosfatidilcolinas.

5 La pepstatina puede acoplarse también con polímeros solubles a título de excipientes medicinales orientados a su objetivo. Tales polímeros pueden comprender la polivinilpirrolidona, los copolímeros de pirano, el polihidroxiopropilmetacrilamidofenol, el polihidroxiethylaspartoamidofenol o el óxido de polietileno-polilisina sustituido con restos de palmitoilo. Además, la pepstatina puede estar acoplada a una clase de polímeros biológicamente

10 Se entiende que el medicamento según la invención puede contener, además de los componentes mencionados en especial anteriormente, otros agentes habituales en el campo en relación al correspondiente tipo de la formulación farmacéutica.

15 Asimismo, los medicamentos según la invención pueden emplearse para preparar efectos aditivos o sinérgicos en el caso de ciertas terapias conocidas, y/o además podrían emplearse para restablecer la eficacia de ciertas terapias existentes.

20 Las preparaciones farmacéuticas según la invención pueden contener, además de pepstatina, otros principios activos farmacéuticos adicionales, por ejemplo para el uso en el tratamiento de artrosis, otros inhibidores de catepsina D, AINE, inhibidores de Cox-2, glucocorticoides, ácido hialurónico, azatioprina, metotrexato, anticuerpos anti-CAM, como por ejemplo anticuerpos anti-ICAM-1 y/o FGF-18. Para el tratamiento de las otras enfermedades mencionadas, las preparaciones farmacéuticas según la invención pueden contener, además de pepstatina, otros principios activos farmacéuticos conocidos por el especialista para su tratamiento.

Incluso sin otras formas de realización, se asume que un especialista puede utilizar la descripción anterior en el alcance más amplio

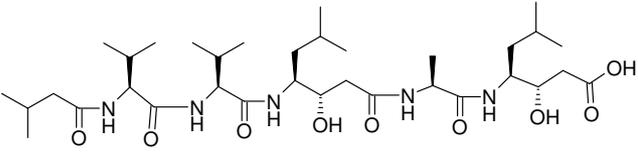
25 Si no se indica lo contrario, los datos de porcentaje son porcentajes en peso. Todas las temperaturas se indican en grados Celsius. «Tratamiento habitual»: en caso necesario se añade agua, en caso necesario se ajusta el valor de pH entre 2 y 10 según la constitución del producto final, se extrae con acetato de etilo o con diclorometano, se separa, se seca la fase orgánica sobre sulfato de sodio, se filtra, se concentra por evaporación y se purifica mediante cromatografía sobre gel de sílice y/o mediante cristalización.

30 Valores R_f en gel de sílice; espectrometría de masas: EI (ionización por impacto electrónico, por sus siglas en inglés): M⁺, FAB (Fast Atom Bombardment): (M+H)⁺, THF (tetrahidrofurano), NMP (N-metilpirrolidona), DMSO (dimetilsulfóxido), AE (acetato de etilo), MeOH (metanol), CCF (cromatografía en capa fina)

Se ha sintetizado y caracterizado la pepstatina. No obstante, el especialista también puede llevar a cabo la elaboración y caracterización de la pepstatina por otras vías.

Ejemplo 1: Pepstatina: un inhibidor peptídico de catepsina D

35 **Tabla 1**

Estructura	CI ₅₀ [M] de Cat D según el ejemplo 2	CI ₅₀ [M] de Cat D según el ejemplo 3
 <p>Pepstatina: Ácido (3S,4S)-3-hidroxi-4-[(S)-2-((3S,4S)-3-hidroxi-6-metil-4-[(S)-3-metil-2-[(S)-3-metil-2-(3-metil-butirilamino)-butirilamino]-butirilamino]-heptanoilamino)-propionilamino]-6-metil-heptanoico</p>	1.6-1,90E-09	0.69-2,40E-09

así como sus sales, derivados, solvatos, profármacos y estereoisómeros fisiológicamente compatibles, incluidas sus mezclas en todas las proporciones.

Además, la pepstatina se caracteriza por su elevada selectividad para la catepsina D frente a la renina ($CI_{50} > 10\ 000\ nM$), su buena penetración en el cartílago y por no presentar toxicidad o genotoxicidad medible.

Ejemplo 2: Ensayo de fluorescencia *in vitro* para la identificación de inhibidores de catepsina D

5 Para la identificación de moduladores de la actividad de la catepsina D se llevó a cabo una prueba enzimática continua con un péptido sintético que presenta un grupo fluorescente (MCA=(7-metoxicoumarin-4-il)acetilo) que se
 10 extingue mediante transferencia de energía de un grupo Dpn (2,4-dinitrofenilo) de la misma molécula en placas de microtitulación nb de 384 pocillos de Greiner. La disociación del sustrato peptídico mediante catepsina D provoca un aumento de la intensidad de fluorescencia. Para determinar la eficacia de las sustancias se comparó el aumento de
 15 intensidad de fluorescencia en función del tiempo en presencia de la sustancia con el incremento de fluorescencia en función del tiempo en ausencia de las sustancias. Como sustancia de referencia se empleó pepstatina A (Sigma-Aldrich). Como sustrato se utilizó MCA-GKPILFFRLK(Dnp)d-R-NH₂ (Enzo Life Sciences, Lörrach, Alemania). Como enzima se empleó catepsina D aislada de hígado humano (Sigma-Aldrich) en una concentración final de 1,4 nM. La prueba se realizó en tampón sodio-acetato 100 mM, DMSO al 1,25 % (v/v), Chaps al 0,25 % (p/v), pH 5,5. Por cada
 20 4 µl de solución de catepsina D se añadieron 2 µl de solución de la sustancia con concentraciones de sustancia diluidas en serie y se incubó 10 min a temperatura ambiente. La reacción se inició mediante la adición de 2 µl de solución de sustrato (concentración final 5 µM). Tras realizar una medición de fluorescencia inicial (longitud de onda de excitación 340 nm/longitud de onda de emisión 450 nm) con un lector Envision Multilabel (Perkin Elmer) se incubó la reacción 60 min a temperatura ambiente. A continuación se midió la cantidad de fragmento peptídico disociado durante el tiempo de reacción mediante la determinación del aumento de intensidad de fluorescencia a 450 nm (longitud de onda de excitación 340 nm).

Resultado: La pepstatina inhibe la catepsina D en el intervalo nanomolar (véase la Tabla 1).

Ejemplo 3: Prueba con explante de cartílago

25 Para estudiar el efecto de potenciales inhibidores de catepsina D sobre la degradación condral se utiliza un modelo inducido por pH que se basa en explantes bovinos. Así, el valor de pH del medio en el que se cultivan los explantes se ajusta al valor de pH patofisiológico de una rodilla artrótica. Este valor de pH es de pH 5,5. A continuación, en este modelo *ex vivo* se estudian potenciales inhibidores de catepsina D respecto a su eficacia en cuanto a un
 30 bloqueo del proceso de debilitamiento condral. Si el cartílago se destruye, se liberan glucosaminoglucanos (GAG) en el sobrenadante del cultivo celular. La cantidad de GAG liberados puede determinarse cuantitativamente con ayuda de DMMB (hidrocloruro de azul de dimetilmetileno). En la comprobación de GAG sulfatados con hidrocloruro de azul de dimetilmetileno se aprovecha la reducción de la absorción a 633 nm. Puesto que también se puede trabajar a concentraciones muy bajas de GAG, no precipita ningún complejo colorante/GAG ni tras una larga incubación de DMMB con GAG, como sucede en otros métodos de medición en ocasiones solo al cabo de poco tiempo. Para determinar la concentración se realiza simultáneamente una gráfica de referencia con sulfato de condroitina. Mediante los valores GAG se pueden calcular los valores CI_{50} , es decir una concentración a la que una sustancia muestra un 50 % de su eficacia.
 35

Soluciones:

Medio de incubación, pH 7,4:

DMEM sin FBS, adición de Pen/Strep al 1 % y 30 µg/ml de ácido ascórbico, el medio no se conserva.

Medio de incubación, pH 5,5:

40 DMEM sin FBS, el valor de pH se ajusta mediante la adición de MES y se controla con un pH-metro, adición de Pen/Strep al 1 % y 30 µg/ml de ácido ascórbico.

Soluciones para la medición de GAG:

Solución colorante con DMMB (V = 500 ml):

45 Disolver 8 mg de DMMB (azul de dimetilmetileno) en 2,5 ml de etanol + 1 g de formiato sódico+ 1 ml de ácido fórmico, enrasar con agua bidest. a 500 ml.

Medio de incubación: FBS (medio sin FBS)

Soluciones de sulfato de condroitina (curva de referencia)

Lote de soluciones estándar con las siguientes concentraciones: 50 µg/ml; 25 µg/ml; 12,5 µg/ml; 6,25 µg/ml; 3,125 µg/ml; 1,56 µg/ml; 0,78 µg/ml así como un blanco del medio. El lote de la solución estándar se realiza en el medio en el que también se ha llevado a cabo el estudio.

1.) Ejecución: degradación condral inducida por pH de explantes bovinos

- 5 Primero se preparan los explantes bovinos. La inducción de la degradación condral se realiza en placas de 96 pocillos. Para ello, se cultiva un explante por pocillo. Se realiza la adición en cada uno de 200 µl de DMEM (medio de incubación pH 5,5) sin FBS + 30 µg/ml de ácido ascórbico. Como control negativo se incuban explantes (n= 4) a pH 7,4 (sin FBS). Este control no entra en el cálculo de los datos, sino que asegura que la modificación del valor de pH tiene el efecto deseado en la liberación de GAG. En este punto se realiza la adición de las sustancias de estudio.
- 10 No se realiza ninguna incubación previa de los explantes. Los explantes se cultivan con las sustancias correspondientes 3 días en una incubadora a 37 °C y 7,5 % de CO₂.

2.) Desarrollo de la incubación

- 15 Para estudiar el efecto de los inhibidores de catepsina D en la liberación de GAG (glucosaminoglucano), se utilizan las sustancias en las concentraciones deseadas y se cultivan durante 3 días. Para ello, los compuestos de estudio se ensayan en un primer experimento a una concentración de 1 µM y DMSO al 1 %. Las sustancias que tienen un efecto de >50 % en la liberación de GAG (que corresponde a <50 % del control en el Assay Explorer), se ensayan en un experimento posterior a 100 nM y DMSO al 1 %. Las sustancias que en estas condiciones tienen un efecto de >50 % en la liberación de GAG (que corresponde a <50 % del control en el Assay Explorer), se ensayan en una relación entre concentración y eficacia. Para ello se estudian los compuestos en las siguientes concentraciones:
- 20 30 µM, 10 µM, 3 µM, 1 µM, 0,3 µM, 0,1 µM, 0,03 µM, 0,01 µM.

- 25 Como control positivo se utiliza pepstatina A con una concentración de 0,01 µM. La ventana de eficacia (assay window) se define mediante el control (pH 5,5), definido como un 0 % de efecto, y el control pH 5,5 + 0,01 µM de pepstatina A, definido como un 100 % de efecto. Tras 3 días de incubación, se recogen los sobrenadantes del cultivo celular y se conservan a -20 °C o se miden directamente. Para ello se mide fotométricamente la cantidad de GAG liberado.

Se expresan para concentraciones de 1 µM y 100 nM del efecto (valor 1) de la sustancia correspondiente en % referido al control positivo (pH 5,5 + 0,01 µM de pepstatina A) y al control negativo (pH 5,5). El valor representa el valor medio de 4 replicados. Para determinar una relación entre concentración y eficacia se expresa un valor CI₅₀ en el banco de datos (Assay Explorer).

30 3.) Medición

- Los sobrenadantes del cultivo celular (200 µl) se miden directamente o bien se conservan a -20 °C. Para garantizar una determinación exacta de la concentración (µg/ml de GAG en el sobrenadante) de GAG, los valores medidos deben encontrarse en la zona lineal de la curva de referencia. Para garantizar esto, se añaden rutinariamente distintas diluciones (1/5, 1/10, 1/20, 1/40). Las diluciones se preparan con medio y se añaden (15 µl) de modo automatizado (Hamilton) en una placa de 384 pocillos. De un modo igualmente automatizado (o con pipetas multicanal) se añaden 60 µl de solución de DMMB. Se produce una reacción de coloración rápida que seguidamente se mide a 633 nm con un lector de placas (p. ej. Envision).
- 35

Según la cantidad de muestra disponible, se lleva a cabo al menos una determinación doble.

- 40 Los datos se obtienen del lector MTP en forma de archivos csv o xls y en base a este formato (xls) se guardan como datos primarios o se preparan para calcular el efecto porcentual del compuesto correspondiente.

4.) Controles de calidad

- 45 Como control para la inducción de la degradación condral inducida por el pH se incuban 4 explantes a pH 7,4. Este valor corresponde al valor de pH fisiológico del cartílago y, por lo tanto, en este caso no se debe esperar ningún efecto en la liberación de GAG. Estos valores de GAG (µg/ml de sobrenadante) siempre son, por lo tanto, significativamente más bajos que los valores de GAG en una incubación con pH 5,5.

Otro control que sirve para comprobar el experimento y también es importante para la definición de la ventana de eficacia, es el control con pepstatina (pH 5,5 + 0,01 µM de pepstatina A). Esta sustancia bloquea de forma no específica la actividad de la mayoría de proteasas y, por lo tanto, establece el efecto máximo posible de un compuesto.

5.) Resultados

En el ensayo de GAG, la pepstatina muestra un valor de CI_{50} en el intervalo nanomolar (véase la Tabla 1).

(1) Klompmakers, A. y Hendriks, T. (1986) Anal. Biochem. 153, 80-84, Spektrophotometrischer Nachweis für sulfatierte Glycosaminoglycane.

5 (2) Groves, P.J. Y col. (1997) Anal. Biochem. 245, 247-248

Use of Polyvinyl Alcohol to Stabilize Binding of Sulfated Glycosaminoglycans to Dimethylmethylene Blue.

Ejemplo 4: Estudio del efecto antihiperalgésico en animales

10 Para inducir una reacción inflamatoria se inyectó intraarticularmente por un lado una solución de carragenano (CAR, 1 %, 50 μ l) en una articulación de rata. El lado no inyectado se consultó para fines de control. Se utilizaron seis animales por grupo. La hinchazón se determinó mediante un micrómetro (medial-lateral en la articulación de la rodilla) y la hiperalgnesia térmica se determinó mediante una fuente de luz de infrarrojos dirigida de acuerdo con el método de Hargreaves (Hargreaves y col. 1988) en la parte inferior del pie. Puesto que el lugar de la inflamación (articulación de la rodilla) difiere del lugar de la medición (parte inferior de la pata), en este caso se habla de hiperalgnesia térmica secundaria, cuyos mecanismos son importantes para encontrar analgésicos eficaces.

15 Descripción del experimento de hiperalgnesia térmica (prueba de Hargreaves): El animal de experimentación se coloca en una cámara de plástico sobre un cristal de cuarzo. Antes del experimento, primero se le dan al animal de experimentación aproximadamente entre 5 y 15 minutos de tiempo para que se acostumbre al entorno. En cuanto el animal de experimentación, tras la fase de exploración, ya no se mueve tan a menudo (fin de la fase de exploración), se coloca la fuente de luz de infrarrojos, cuyo foco se encuentra en el nivel del suelo de cristal, directamente debajo
20 de la pata trasera que debe estimularse. En este momento se inicia una ejecución del experimento pulsando un botón: a través de los infrarrojos se produce el aumento de temperatura de la piel de la pata trasera. El experimento se termina o bien porque el animal de experimentación levanta la pata trasera (como expresión de haber alcanzado el umbral de dolor) o bien porque se alcanza una temperatura máxima fijada mediante el apagado automático de la fuente de luz de infrarrojos. Mientras el animal de experimentación está sentado quieto, se registra la luz que se refleja de la pata. Si retira la pata, se interrumpe esta reflexión, con lo cual se apaga la fuente de luz de infrarrojos y se registra el tiempo desde el encendido hasta el apagado. El aparato está calibrado de modo que la fuente de luz
25 de infrarrojos aumenta la temperatura de la piel hasta aproximadamente 45 grados Celsius en 10 s (Hargreaves y col. 1988). Para el experimento se utiliza un aparato de la empresa Ugo Basile fabricado para esta finalidad.

30 El CAR se compró a Sigma-Aldrich. La administración de los inhibidores específicos de catepsina D según la invención se realizó intraarticularmente 30 minutos antes del CAR. Como control positivo se utilizó 10 μ g/articulación de triamcinolona (TAC) y como control negativo se utilizó el disolvente (vehículo). La hiperalgnesia se indica como la diferencia de los tiempos de retirada entre la pata inflamada y la no inflamada.

Resultado: El TAC pudo reducir la hinchazón inducida por CAR, pero no la pepstatina. A diferencia de esto, la pepstatina pudo reducir la magnitud de la hiperalgnesia térmica según la dosis.

35 Valoración: Se ha podido demostrar que la pepstatina ejerce un efecto antihiperalgésico. Esto puede postularse porque la pepstatina no ha demostrado ningún efecto en la hinchazón inflamatoria y, por lo tanto, en el desencadenante de la hiperalgnesia. Por consiguiente, puede aceptarse que la pepstatina muestra un efecto reductor del dolor en humanos.

Ejemplo 5: Estabilidad de la pepstatina en líquido sinovial bovino

40 1.) Obtención de líquido sinovial bovino

Para la preparación de explantes bovinos (para la cámara de difusión u otras pruebas) se utilizan o bien pezuñas de vacuno (articulaciones metacarpianas) o bien rodillas de vacuno. El líquido sinovial se puede obtener de las dos articulaciones. Para ello, en el orificio de la articulación se retira con cuidado el líquido sinovial de la articulación con una jeringa de 10 ml y una cánula y se vierte en recipientes Eppendorf de 2 ml ya listos. Los recipientes Eppendorf
45 se rotulan según el animal (identificación del vacuno disponible). Para ello se debe prestar atención a que en la preparación de la articulación no entre sangre en la cavidad articular. Si es así, el líquido sinovial se tiñe de rojo y, por lo tanto, debe desecharse. El líquido sinovial en principio es muy viscoso y tiene un color de transparente a amarillo. Se documenta la extracción junto con un análisis macroscópico del líquido sinovial.

2.) Planteamiento del análisis de estabilidad de las sustancias en LS

Para estudiar la estabilidad de los compuestos individuales se mezcla un conjunto de 4 líquidos sinoviales bovinos distintos. Para ello se utiliza aproximadamente 1 ml de cada LS. La mezcla se coloca directamente en un recipiente de cristal de 5 ml para minimizar los posibles efectos de absorción. Los LS se mezclan concienzuda pero cuidadosamente. Con ello, no deben formarse burbujas de aire ni espuma. Para ello se utiliza un aparato tipo vórtex al nivel mínimo. Los compuestos de estudio se analizan en una concentración inicial de 1 µM (si no se requiere de otro modo). Tras la adición de la sustancia, se vuelve a realizar una mezcla concienzuda y cuidadosa del lote. Para el control óptico se fotografian todos los lotes de LS y las fotografías se guardan en la carpeta eLabBio del experimento correspondiente. Los lotes se incuban durante 48 h a 37 °C y CO₂ al 7,5 % en una incubadora.

3.) Toma de muestras

La toma de muestras se realiza de acuerdo con los tiempos previamente consensuados (si no se requiere de otro modo, véase abajo). Para ello, se toman cuatro veces respectivamente 200 µl del LS de la mezcla y se transfieren directamente a recipientes Eppendorf «Low-binding» de 0,5 ml. Se utilizan recipientes Eppendorf «Low-binding» para minimizar una interacción de las sustancias con el plástico de los recipientes. En el recipiente Eppendorf ya se habían añadido respectivamente 200 µl de acetonitrilo, de modo que luego se obtiene una mezcla 1 + 1 del LS. Esto facilita el posterior análisis, pero justo tras la adición del LS puede producirse la precipitación de la proteína. Esto debe anotarse en el protocolo. Justo tras la adición de la sustancia se toma la muestra 0 h. Esto corresponde al valor 100 % del cálculo de la estabilidad. Lo ideal sería que aquí se volviera a encontrar la concentración utilizada. Las muestras pueden congelarse a -20 °C.

- 0 h
- 6 h
- 24 h
- 48 h

Como control negativo se utiliza LS sin sustancia. Como control positivo se utiliza LS con 1 µM de sustancia. Esto corresponde al valor 0 h y, por lo tanto, a una estabilidad del 100 %.

La conservación de las muestras se lleva a cabo en recipientes Eppendorf «Low-binding» a -20 °C. A continuación las muestras se analizan cuantitativamente. La comprobación de las sustancias correspondientes se realiza por espectrometría de masas.

4.) Procesamientos de los datos

Las concentraciones medidas (ng/ml) se representan en una gráfica (GraphPad Prism®) en función del tiempo. Con esto se determina la estabilidad porcentual de la sustancia. Como valor 100 % se utiliza el valor de partida en el LS en el momento 0 h. Los datos se guardan bajo el correspondiente número de experimento en eLabBio y se comunican al banco de datos MSR (en forma de estabilidad porcentual de acuerdo con los correspondientes tiempos de incubación).

5.) Resultados

La pepstatina permanece estable en el líquido sinovial durante un periodo de tiempo de al menos dos semanas (véase la Figura 1).

Ejemplo 6: Datos farmacocinéticos tras la inyección intraarticular

Para este estudio (KK-Rat-12-003) se han usado 14 ratas Lister Hooded macho. A todas las ratas se les administró una vez una inyección intraarticular en ambas articulaciones de la rodilla en el momento «0». Una inyección estaba compuesta por 30 µl, en los cuales se habían suspendido homogéneamente aprox. 700 µg de compuesto (Suspensión = Compuesto en Methocel K4M 0,5 % con Tween20 0,25 % en PBS). La suspensión se aplicó mediante una cánula 25G. No se registraron particularidades respecto a posibles modificaciones de los parámetros in vivo, como p. ej. el peso corporal, hinchazones de rodilla o posturas para evitar dolores. En cada momento indicado en la Tabla 2 se mataron animales, se prepararon las articulaciones de rodilla (eliminación de tejidos cutáneos y musculares) y se congelaron para el tratamiento ulterior.

Las articulaciones congeladas se descongelaron al poco rato, se desmenuzaron lo máximo posible con el cincel para huesos y a continuación se agregó el cuádruple de volumen de etanol al 80 %. A continuación se homogeneizó con el Ultraturrax, se agitó el extracto durante 20 minutos a TA y después se almacenó al menos 30 minutos a -20 °C. Después se centrifugó 5 minutos a 13 000 rpm, se diluyó una alícuota de 10 µl del sobrenadante con solución estándar interna en proporción 1:5000, se transfirió a una placa de PCR y se analizó.

Se combinaron 20 μ l de plasma con 20 μ l de solución estándar interna, se añadieron 100 μ l de metanol y se agitó durante 5 minutos. Después se almacenaron los extractos al menos 30 minutos a -20 °C y a continuación se centrifugó 5 minutos a 13 000 rpm. Se transfirieron 80 μ l del sobrenadante a una placa de PCR y se analizaron.

5 Todas las muestras se analizaron con ayuda de un sistema UPLC-MS/MS. Los límites de detección para pepstatina fueron 0,1 ng/ml en plasma y 8 μ g/g en tejido.

Tabla 2: diámetro de la articulación de la rodilla en mm

Días tras la inyección	Valor medio del diámetro de la articulación [mm]	SD	N (articulaciones inyectadas)
0	10,08	0,31746745	28
1	10,88	0,49042038	26
2	10,50	0,30862869	16
4	10,12	0,19734488	16
7	10,35	0,19478086	16
9	10,14	0,18101258	10
11	10,37	0,15579188	10
13	10,24	0,17707444	8
15	10,45	0,15238579	8
20	10,18	0,15942605	6
27	10,50	0,11189281	6

10 Tras la administración intraarticular de una suspensión, la pepstatina muestra un tiempo de permanencia medio de aprox. 106 horas en la articulación de la rodilla de la rata y, debido a la liberación lenta desde el líquido sinovial y al aclaramiento muy elevado en la sangre, solo una exposición sistemática muy baja. En el plasma, la pepstatina muestra una cinética llamada Flip-Flop, es decir que la semivida del plasma terminal no se determina mediante la eliminación, sino mediante la liberación de pepstatina desde la suspensión y la difusión a través de la membrana sinovial. Se pudo detectar la pepstatina en el plasma, no obstante en muy baja concentración, hasta 28 días tras la administración (véase la Figura 2).

15 **Ejemplo 7: Datos farmacocinéticos tras la administración intravenosa (i.v.) y oral (v.o.)**

20 Los parámetros farmacocinéticos de la pepstatina se determinaron en ratas Wistar (BW de aprox. 250 g), tras la administración de la sustancia de ensayo en un cóctel de hasta 4 sustancias. Se administró pepstatina a las ratas macho (n=3 por tipo de administración) o bien mediante una inyección de bolo i.v. en la vena de la cola o mediante una sonda oral con una cánula de acero inoxidable. Las sustancias de ensayo se disolvieron en DMSO/PEG200/agua (2/60/38 v/v) con una concentración final de 0,8 mg/ml y se administró una dosis de 0,2 mg/kg i.v. y 0,5 mg/kg por vía oral. Las muestras de sangre (200 μ l) se tomaron bajo anestesia ligera con isoflurano a través de la vena sublingual en los siguientes momentos tras la administración: iv: 0,1, 0,5, 1, 2, 4, 6 y 24 h; vo: 0,25, 0,5, 1, 2, 4, 6 y 24 h.

25 Las muestras de sangre se recogieron en tubos de centrifugación con heparina de litio y se centrifugaron 3 minutos a 4 °C con aprox. 10 000 g. El plasma resultante se congeló de inmediato a -20 °C y se guardó hasta el análisis. Las concentraciones plasmáticas se determinaron mediante un método LC-MS/MS estándar. Los parámetros farmacocinéticos (Clp, Vee, T1/2, F) se calcularon mediante un análisis NCA.

30 Tras la administración intravenosa, la pepstatina muestra un aclaramiento muy elevado (> 100 % del flujo sanguíneo del hígado), un volumen de distribución medio y, en consecuencia, una semivida en plasma muy breve (aprox. 0,14 h). Tras la administración oral, todas las concentraciones plasmáticas estaban por debajo del límite de detección (véase la Figura 3).

Ejemplo 8: Eficacia (*in vivo*) de la pepstatina en la artrosis: modelo ACLT tMx

Se seleccionaron ratas como animales de ensayo. Tras el afeitado y la desinfección se abre la zona de operación mediante una incisión medial en la piel de aprox. 1 cm de longitud. La cápsula de la articulación de la rodilla se prepara y se presenta el ligamento patelar medial. Tras abrir la cápsula articular, separar los ligamentos parapatelares mediales y desplazar la rótula hacia el lateral, se corta el ligamento cruzado anterior con un bisturí curvo de punta roma (ACLT = Anterior Cruciate Ligament Transection). A continuación, se prepara el ligamento anterior y posterior de fijación del menisco y se corta y se saca el menisco tMx (resectomía del menisco medial). Tras el reposicionamiento de la rótula, finalmente se lava la articulación con solución salina estéril para eliminar los posibles coágulos de sangre formados.

La rótula se reposiciona y el ligamento rotular medial se fija de nuevo mediante sutura continua cerrando la cápsula. La musculatura también se sutura. A continuación se cierra la piel mediante grapas individuales. La duración de la operación es de aprox. 10 minutos. La duración del ensayo postoperatorio fue de 6 semanas.

Para la inyección intraarticular se anestesiaron los animales con isoflurano al 1,5-2 % en volumen. Antes de la inyección, se inyecta buprenorfina por vía subcutánea. La zona de la inyección se afeitó con cuidado y se desinfectó. La articulación de la rodilla se coloca en una posición ligeramente flexionada y se inyecta la sustancia de ensayo o el vehículo en la articulación.

Para el presente ensayo se usó 1 mg de pepstatina en 30 µl. Como control negativo, se inyectó solamente el vehículo en un grupo de ensayo. Como control positivo se usó respectivamente la pata trasera no operada de la rata.

Procesamiento en la histología

Las muestras de tejido tomadas se fijan en paraformaldehído (4 %) durante al menos 72 horas y al cabo de 24 horas se enjuagan con agua corriente. A continuación se descalcifican las muestras mediante Osteosoft durante un periodo de 4 semanas. Después se realiza la infiltración del tejido con parafina y la elaboración de cortes histológicos con 7 µm de grosor. Para la evaluación, se tiñeron los cortes con safranina O Fast Green.

Evaluación

De cada animal se seleccionan dos cortes en la zona de carga y dos personas experimentadas los evaluaron mediante un sistema de evaluación. El sistema de evaluación se basa en el trabajo de V.B. Kraus y col. (Osteoarthritis & Cartilage, 18, pág. 3, 2010).

Resultados

La pepstatina también muestra una eficacia significativa *in vivo* para la artrosis (véase la Figura 4)

Ejemplo 9: Microdiálisis

Los niveles de medicamento libre en el lugar de actuación son decisivos para el efecto de un medicamento. En las inyecciones realizadas por vía intraarticular, el área de distribución en el líquido sinovial es de gran interés a este respecto.

Se ha usado el procedimiento de microdiálisis, ya que, por una parte, el líquido sinovial representa una matriz compleja para la determinación analítica de péptidos y, por otra parte, solo el medicamento libre, es decir no unido a proteínas, es relevante para el efecto. El eluato obtenido en la microdiálisis permite un análisis de los niveles de medicamento libre de la matriz compleja del líquido sinovial. El motivo es que se usa una membrana de bloqueo (membrana de microdiálisis) que solo pueden atravesar moléculas de hasta un determinado tamaño. Además de la velocidad de flujo del eluato y de la concentración libre disponible del medicamento en el líquido sinovial como fuerza impulsora para el intercambio de sustancias, este «tamaño de poro» determina la concentración del medicamento en el eluato.

Para los presentes experimentos se usaron sondas de microdiálisis de la empresa CMA (número de referencia 000082; CMA 7; muestra de microdiálisis 1 mm 3/pkg) equipadas con una membrana de cuprofano y un tamaño de poro de 6 kDa. El flujo de eluato fue de 0,5 µl/min.

Primero se estudió la cinética de liberación en líquido sinovial de bovino y se comparó con triamcinolona (Triam Injekt® 20 mg), un medicamento aprobado para la inyección intraarticular. Aquí la triamcinolona se usó en suspensión de cristales ya disueltos, mientras que los cristales de pepstatina se añadieron al líquido sinovial directamente y sin disolver. Se emplearon 3 mg de medicamento por ml de líquido sinovial en un recipiente de cristal, lo cual corresponde aproximadamente a las proporciones de concentración tras la inyección intraarticular en

la articulación de la rodilla. Sorprendentemente y a diferencia de la triamcinolona, se midieron niveles muy elevados de pepstatina no unida. Los niveles más o menos constantes también indican una rápida velocidad de disolución con una elevada estabilidad de la pepstatina en el líquido sinovial (véase la Figura 5a).

- 5 Debido a la elevada solubilidad de la pepstatina en el líquido sinovial, los resultados de la microdiálisis articular en conejillos de indias (Dunkin Hartley) son sorprendentes: Se pueden encontrar niveles significativos de pepstatina en la articulación hasta 14 días después de la inyección intraarticular de pepstatina [1 mg/articulación administrado en 50 µl como suspensión] y además en casi todos los eluatos examinados (véanse las Figuras 5b y 5c).

REIVINDICACIONES

- 5 **1.** Preparación farmacéutica que contenga pepstatina y/o una de sus sales, solvatos y estereoisómeros fisiológicamente compatibles, incluidas sus mezclas en todas las proporciones, y otros vehículos y/o excipientes, para su uso como medicamento en el tratamiento y/o la profilaxis de estados fisiológicos y/o patofisiológicos seleccionados del grupo compuesto por artrosis, lesiones condrales traumáticas, artritis, dolor, alodinia o hiperalgesia, en los que la preparación farmacéutica se administra por vía intraarticular de la siguiente manera:
- a) desde semanalmente hasta anualmente,
 - b) desde cada 14 días hasta semestralmente o
 - c) desde mensualmente hasta trimestralmente.
- 10 **2.** Preparación farmacéutica para el uso de acuerdo con la reivindicación 1 que contiene al menos otro principio activo farmacéutico.
- 3.** Preparación farmacéutica para el uso de acuerdo con las reivindicaciones 1 o 2 para el uso como medicamento en el tratamiento y/o la profilaxis de la artrosis.
- 15 **4.** Pepstatina y/o una de sus sales, solvatos y estereoisómeros fisiológicamente compatibles, incluidas sus mezclas en todas las proporciones, para su uso como medicamento en el tratamiento y/o la profilaxis de estados fisiológicos y/o patofisiológicos seleccionados del grupo compuesto por artrosis, lesiones condrales traumáticas, artritis, dolor, alodinia e hiperalgesia, en los que la pepstatina y/o una de sus sales, solvatos y estereoisómeros fisiológicamente compatibles, incluidas sus mezclas en todas las proporciones, se administra intraarticularmente de la siguiente manera:
- 20 a) desde semanalmente hasta anualmente,
 - b) desde cada 14 días hasta semestralmente o
 - c) desde mensualmente hasta trimestralmente.
- 25 **5.** La pepstatina y/o una de sus sales, solvatos y estereoisómeros fisiológicamente compatibles, incluidas sus mezclas en todas las proporciones, de acuerdo con la reivindicación 4 para el uso como medicamento en el tratamiento y/o la profilaxis de la artrosis.

Figura 1: Datos de estabilidad de la pepstatina en el líquido sinovial:

Tiempo (h)	% restante	-ln restante
0	100	0,000
6	100	0,002
24	98,4	0,016
48	92,0	0,083
72	90,3	0,102
144	91,3	0,0912
216	89,9	0,106
312	71,6	0,335

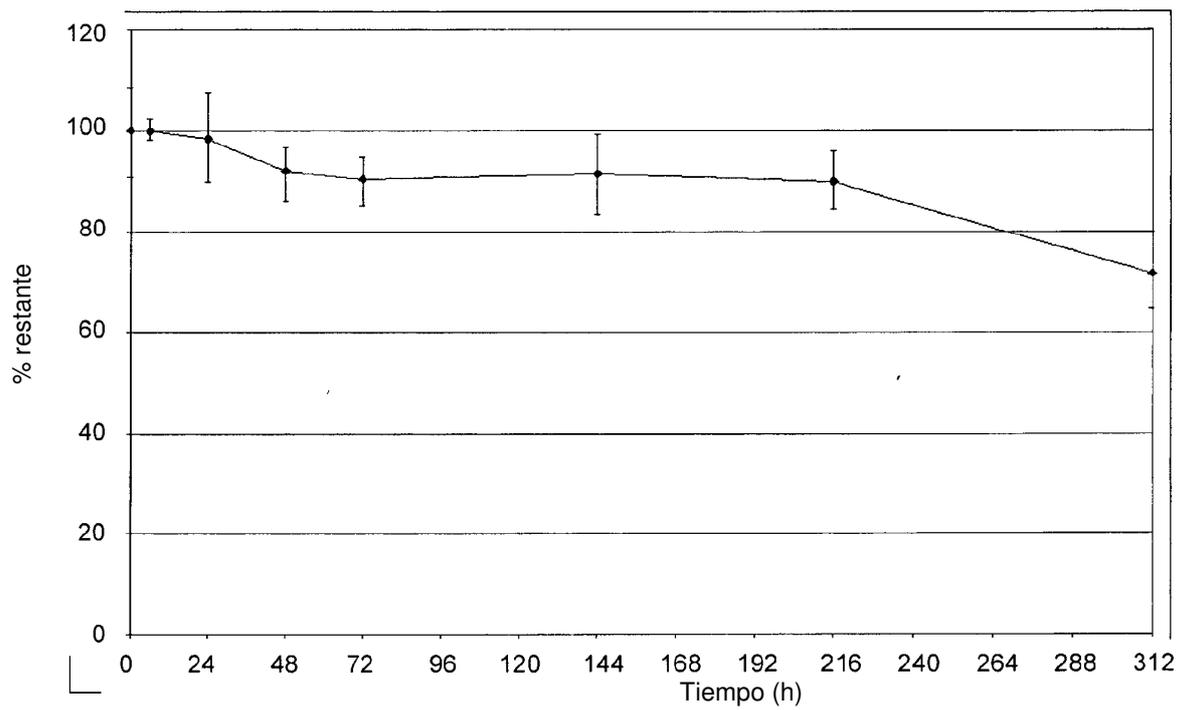


Figura 2: Farmacocinética: tiempo de permanencia de la pepstatina en la articulación y en el plasma tras la administración intraarticular

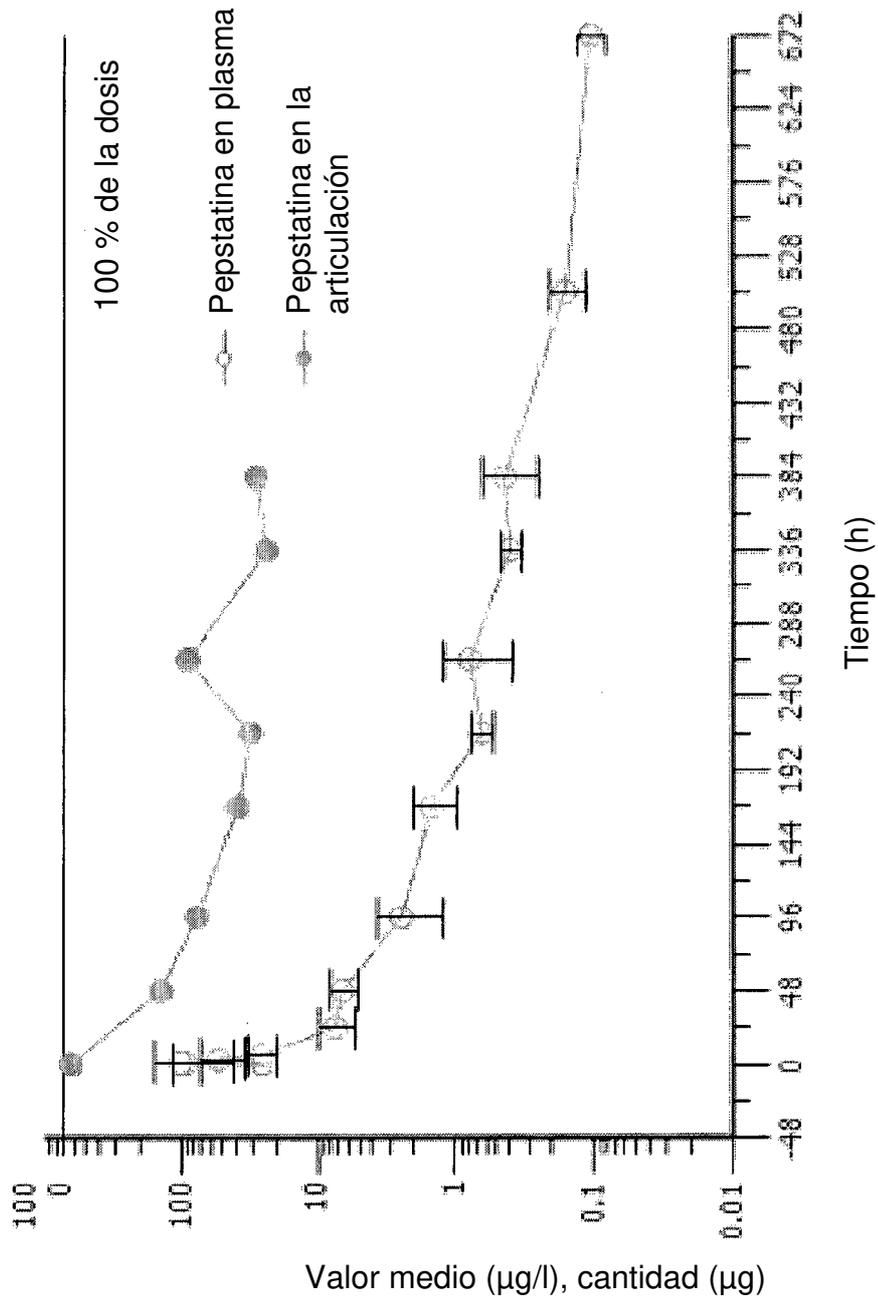


Figura 3: Farmacocinética: tiempo de permanencia de la pepstatina en el plasma tras la administración intravenosa y oral

Concentraciones plasmáticas normalizadas para la dosis (C [ng/ml] / dosis [mg/ml]) y parámetros farmacocinéticos de pepstatina tras la administración intravenosa (iv) y oral (vo) en ratas macho.

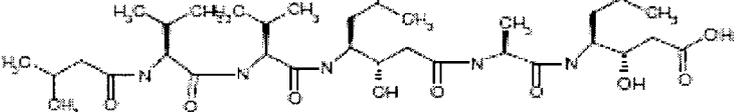
Estructura molecular		
Administración	iv	vo
Dosis [mg/kg]	0,2	0,5
Matriz	Plasma	Plasma
Tiempo [h]		
0,1	396	ND
0,25	ND	<LLOQ
0,5	17,7	<LLOQ
1	4,19	<LLOQ
2	<LLOQ	<LLOQ
4	<LLOQ	<LLOQ
6	<LLOQ	<LLOQ
24	<LLOQ	<LLOQ
Parámetros		
C _{máx} [ng/ml] / Dosis [mg/kg]	396	<LLOQ
t _{máx} [h]	0,100	NA
AUC [h • ng/ml] / Dosis [mg/kg]		
0 - t último	113	NA
0 - ∞	114	
t _{1/2} [h]		
0,1 - t último	0,140	
CL [L/h/kg]	8,76	
V _{ee} [L/kg]	1,31	
Recuperación [% de la dosis] de principio activo no modificado en las heces y la orina (recolección 0-24 h)		
Heces	52	37
Orina	1,8	<1
Biodisponibilidad (%)		<5
Cl _{int} [μl/min/mg]	<10	
Flib[%]	>29	NA
C _{máx} libre a 1 mg/kg [nM]	>173	
Cl ₅₀ bioquímico [nM]	<1	
Cl ₅₀ celular [nM]	NA	

Figura 4: Modelo ACTL

Pepstatina	PVP Lutrol	Control (cl)
4,	21,	5,
8,	12,	4,
15,	17,	9,
13,	22,	5,
24,	21,	6,
9,	20,	2,

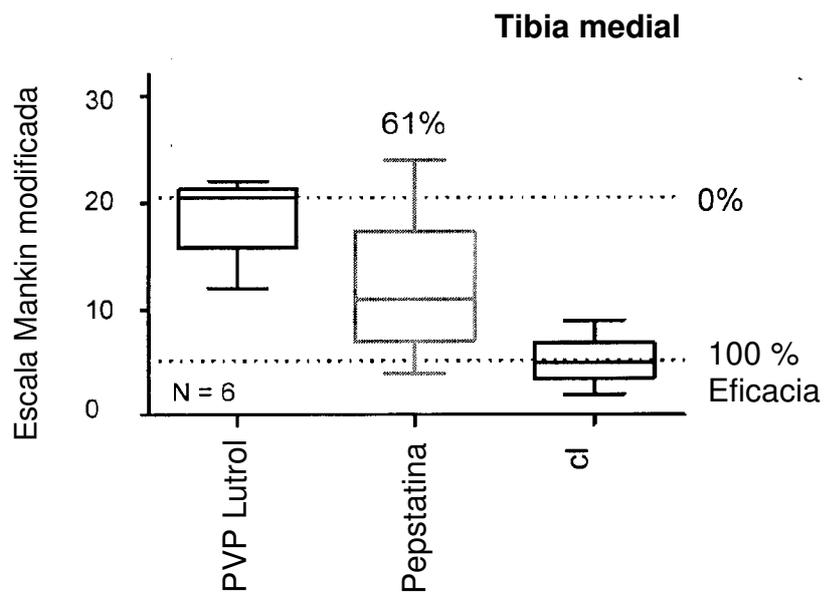


Figura 5a:

***in vitro*: Microdiálisis en líquido sinovial bovino**

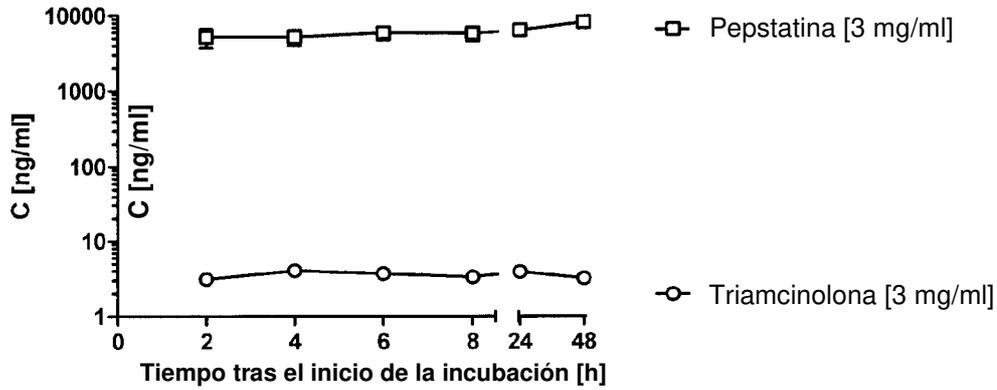


Figura 5b:

In vivo: Microdiálisis en la articulación de la rodilla (conejo de indias)

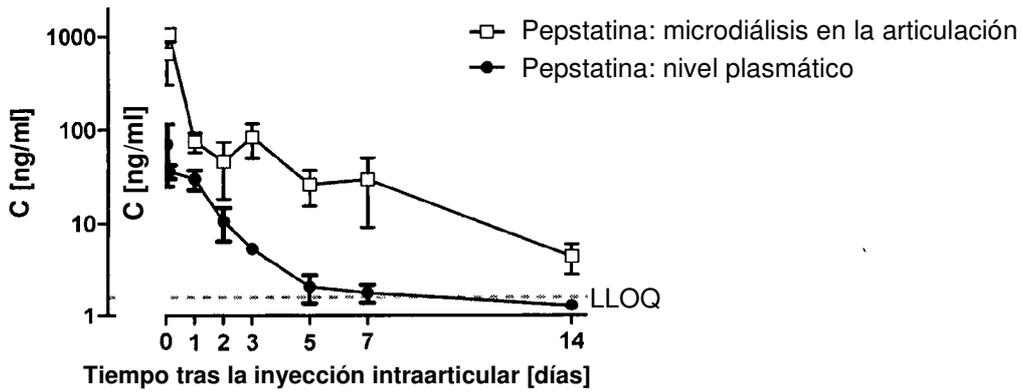


Figura 5c:

Número de muestras de eluato positivas

