

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 795 803**

51 Int. Cl.:

**A61K 9/00** (2006.01)

**A61K 38/00** (2006.01)

**A61P 19/02** (2006.01)

**A61K 31/4965** (2006.01)

**A61K 38/12** (2006.01)

**A61K 31/495** (2006.01)

**A61K 45/06** (2006.01)

**A61K 31/167** (2006.01)

**A61K 31/405** (2006.01)

**A61K 31/573** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **10.10.2012 PCT/US2012/059455**

87 Fecha y número de publicación internacional: **18.04.2013 WO13055734**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **10.10.2012 E 12839256 (0)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **25.03.2020 EP 2766029**

54 Título: **Tratamiento de artropatía degenerativa**

30 Prioridad:

**10.10.2011 US 201161545474 P**

**17.11.2011 US 201161561221 P**

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

**24.11.2020**

73 Titular/es:

**AMPIO PHARMACEUTICALS, INC. (100.0%)  
373 Inverness Parkway, Suite 200  
Englewood, CO 80112, US**

72 Inventor/es:

**BAR-OR, DAVID y  
WINKLER, JAMES, V.**

74 Agente/Representante:

**PONS ARIÑO, Ángel**

ES 2 795 803 T3

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

## DESCRIPCIÓN

Tratamiento de artropatía degenerativa

## 5 Campo de la invención

La invención se refiere a una composición para usar en un método de tratamiento de una artropatía degenerativa. El método comprende administrar una cantidad eficaz de una composición farmacéutica que comprende una dicetopiperazina con cadenas laterales de aminoácidos de ácido aspártico y alanina (DA-DKP). La invención también proporciona un producto farmacéutico que comprende DA-DKP.

## Antecedentes

La artrosis es la forma de artritis más habitual, que afecta a 25 a 35 millones de personas en EE.UU. El dolor crónico y la discapacidad de la artrosis son causados inicialmente por respuestas inflamatorias en el cartílago y el hueso de las articulaciones que empeoran gradualmente con el tiempo. La artrosis sintomática de la rodilla ocurre en un 10 a un 13 % de las personas de 60 años o más. La artrosis de rodilla por sí sola aumenta el riesgo de pérdida de movilidad, tal como la necesidad de asistencia para caminar o subir escaleras, mayor que para cualquier otra afección médica en personas de 65 años o más.

El tratamiento farmacológico actual para la artrosis de la rodilla se limita a analgésicos, fármacos antiinflamatorios no esteroideos (AINE) e inyecciones de esteroides intrarticulares, todos los cuales tienen limitaciones significativas debido a los efectos indeseables. A pesar de estos tratamientos médicos, la artrosis crónica de rodilla a menudo causa una discapacidad progresiva que requiere un reemplazo total de la articulación. La creciente prevalencia de la artrosis de la rodilla debido al envejecimiento y las poblaciones obesas sugiere una creciente necesidad clínica de tratamientos locales seguros y eficaces para la rodilla que retrasen y eliminen potencialmente la necesidad de tratamientos quirúrgicos más extensos.

El documento US 2010/143338 divulga el tratamiento de enfermedades mediadas por linfocitos T. El documento US 6.555.343 divulga un método para usar dicetopiperazina y composiciones que la contiene.

## Sumario de la invención

La presente invención se refiere a una composición farmacéutica que comprende DA-DKP, para usar en un método de tratamiento de una artropatía degenerativa en un animal.

También se divulga en el presente documento una composición para usar en un método de tratamiento de una artropatía degenerativa mediante la administración a un animal que lo necesita de una cantidad eficaz de una composición farmacéutica que comprende DA-DKP. En un aspecto, la artropatía degenerativa es artrosis.

En otro aspecto, la composición se administra no más frecuentemente que una vez cada seis meses, una vez cada 5 meses, una vez cada 4 meses, una vez cada 3 meses o una vez cada 2 meses.

En otro aspecto más, la composición se puede administrar mediante diversas vías de administración. Por ejemplo, la vía de administración puede ser por administración local, administración tópica o inyección. En un aspecto, la administración mediante inyección es mediante inyección intrarticular. En otro aspecto más, la composición administrada mediante inyección intrarticular es una composición que tiene una concentración de DA-DKP de aproximadamente 50 mM a aproximadamente 350 mM.

En otro aspecto más, la composición incluye además N-acetil-triptófano (NAT), ácido caprílico, caprilato o combinaciones de los mismos. En otro aspecto más, la concentración de NAT, ácido caprílico, caprilato o combinaciones de los mismos en la composición puede ser de aproximadamente 4 mM a aproximadamente 20 mM.

En otros aspectos del método, la DA-DKP está en una composición preparada mediante la eliminación de albúmina de una solución de una composición de seroalbúmina humana. Por ejemplo, la etapa de eliminación puede ser mediante el tratamiento de la composición de seroalbúmina humana mediante un método de separación. Dichos métodos de separación pueden incluir ultrafiltración, centrifugación en gradiente de sacarosa, cromatografía, precipitación salina y sonicación. Además, la etapa de eliminación puede ser mediante el paso de la composición de seroalbúmina humana sobre una membrana de ultrafiltración con un límite de peso molecular que retiene la albúmina, y el filtrado resultante contiene la DA-DKP. En un aspecto, la membrana de ultrafiltración tiene un límite de peso molecular de menos de 50 kDa. En otro aspecto más, la membrana de ultrafiltración tiene un límite de peso molecular de menos de 40 kDa, menos de 30 kDa, menos de 20 kDa, menos de 10 kDa, menos de 5 kDa o menos de 3 kDa. En otro aspecto más, esta composición comprende además NAT, ácido caprílico, caprilato o combinaciones de los mismos. En otro aspecto más, la concentración de NAT, ácido caprílico, caprilato o combinaciones de los mismos en la composición puede ser de aproximadamente 4 mM a aproximadamente 20 mM.

En otro aspecto, el método divulgado en el presente documento puede incluir además administrar un segundo fármaco. Por ejemplo, el segundo fármaco puede ser un analgésico, un fármaco antiinflamatorio o combinaciones de los mismos.

Además, en el presente documento se divulga un producto farmacéutico que comprende una composición que contiene DA-DKP formulada para administración mediante inyección. En un aspecto, el producto está formulado para administración mediante inyección intrarticular. En otro aspecto, la DA-DKP se prepara mediante la eliminación de albúmina de una solución de una composición de seroalbúmina humana. En un aspecto, la etapa de eliminación de la albúmina puede ser mediante el tratamiento de la composición de seroalbúmina humana mediante un método de separación. Por ejemplo, el método de separación puede ser ultrafiltración, centrifugación en gradiente de sacarosa, cromatografía, precipitación salina o sonicación. Además, la etapa de eliminación puede ser mediante el paso de la composición de seroalbúmina humana sobre una membrana de ultrafiltración con un límite de peso molecular que retiene la albúmina, y el filtrado resultante contiene DA-DKP. En un aspecto, la membrana de ultrafiltración tiene un límite de peso molecular de menos de 50 kDa. En otro aspecto más, la membrana de ultrafiltración tiene un límite de peso molecular de menos de 40 kDa, menos de 30 kDa, menos de 20 kDa, menos de 10 kDa, menos de 5 kDa o menos de 3 kDa.

En otro aspecto más, la DA-DKP del producto farmacéutico que se administra mediante inyección intrarticular es una composición que tiene una concentración de DA-DKP de aproximadamente 50 mM a aproximadamente 350 mM.

En otro aspecto más, el producto contiene la composición de DA-DKP que además contiene NAT, ácido caprílico, caprilato o combinaciones de los mismos. En otro aspecto más, la concentración de NAT, ácido caprílico, caprilato o combinaciones de los mismos en el producto puede ser de aproximadamente 4 mM a aproximadamente 20 mM.

En otro aspecto más, el producto farmacéutico contiene además un vehículo farmacéuticamente aceptable.

En el presente documento también se divulga un kit que incluye un producto farmacéutico. En un aspecto, el producto incluye una composición que contiene DA-DKP formulada para administración mediante inyección. En otro aspecto más, la DA-DKP en el kit se prepara mediante la eliminación de albúmina de una solución de una composición de seroalbúmina humana.

### Breve descripción de los dibujos

La Figura 1 muestra el cambio de la media en una escala de puntuación numérica (NRS, de sus siglas en inglés) del dolor para sujetos tratados con una única inyección de 10 ml en una rodilla de Ampion™ (fracción de PM < 5000) combinada con una suspensión de esteroide (betametasona)/lidocaína o inyectada con un placebo de solución salina combinada con una suspensión de esteroide (betametasona)/lidocaína. Las puntuaciones se completaron 6 horas después de la dosis en el día 1, 24 horas después de la dosis en el día 2 y 72 horas después de la dosis en el día 4.

La Figura 2 muestra el cambio de la media en una NRS del dolor como se describe en la Figura 1 e incluye un análisis de varianza (ANOVA) de medidas repetidas.

La Figura 3A muestra la diferencia absoluta en las subpuntuaciones de dolor WOMAC (Índice 3.1 de artrosis de la universidad de Western Ontario McMaster) a las 24 horas para el tratamiento descrito en la Figura 1.

La Figura 3B muestra la diferencia absoluta en las subpuntuaciones de dolor WOMAC a las 72 horas para el tratamiento descrito en la Figura 1.

La Figura 4A muestra la diferencia absoluta en las subpuntuaciones de rigidez WOMAC a las 24 horas para el tratamiento descrito en la Figura 1.

La Figura 4B muestra la diferencia absoluta en las subpuntuaciones de rigidez WOMAC a las 72 horas para el tratamiento descrito en la Figura 1.

La Figura 5A muestra la diferencia absoluta en las subpuntuaciones de función WOMAC a las 24 horas para el tratamiento descrito en la Figura 1.

La Figura 5B muestra la diferencia absoluta en las subpuntuaciones de función WOMAC a las 72 horas para el tratamiento descrito en la Figura 1.

La Figura 6 muestra una posible evolución temporal de esteroides.

La Figura 7 muestra el cambio de la media desde los valores iniciales en todas las visitas de los sujetos para el tratamiento descrito en la Figura 1. ("MC" significa mínimos cuadrados)

### Descripción detallada de la invención

En el presente documento, se divulga una composición para usar en un método de tratamiento de una artropatía degenerativa. El tratamiento comprende administrar una cantidad eficaz de una composición farmacéutica que comprende aspartil-alanil-dicetopiperazina (DA-DKP) a un individuo que lo necesite. La DA-DKP tiene múltiples efectos antiinflamatorios e inmunomoduladores que incluyen la inhibición de múltiples citocinas proinflamatorias, quimiocinas y moléculas de señalización a nivel de transcripción, inhibición de la migración y adhesión de linfocitos T y monocitos, actividad a nivel de receptor de proteína acoplada a G, actividad en acontecimientos citoesqueléticos dependientes de actina, reducción de la permeabilidad vascular e inhibición de la inflamación inducida por el factor activador de plaquetas. Como se describe con mayor detalle a continuación, se ha encontrado que los efectos de DA-DKP sobre

la artropatía degenerativa son inesperadamente duraderos y, en algunos estudios, se encontró que aumentaron en el tiempo en comparación con el uso de esteroides.

En el presente documento se divulga un producto farmacéutico que comprende una composición de DA-DKP. La DA-DKP del producto puede prepararse mediante la eliminación de albúmina de una solución de seroalbúmina humana.

En el presente documento también se divulga un kit que comprende una composición de DA-DKP formulada para administración mediante inyección.

Una artropatía degenerativa es un deterioro gradual del cartílago articular que cubre las articulaciones. Una artropatía degenerativa (artrosis) es un trastorno progresivo no infeccioso de las articulaciones que soportan peso. El cartílago articular normal es liso, blanco y translúcido. Se compone de células de cartílago (condrocitos) incrustadas en una matriz esponjosa hecha de colágeno, polisacáridos proteicos y agua. Con la artritis primaria temprana, el cartílago se vuelve amarillo y opaco con áreas localizadas de ablandamiento y rugosidad de las superficies. A medida que progresa la degeneración, las áreas blandas se agrietan y desgastan, exponiendo el hueso debajo del cartílago. Luego, el hueso comienza a remodelar y aumentar la densidad, mientras que el cartílago restante comienza a deshilacharse. Finalmente, los osteófitos (espolones de hueso nuevo) cubiertos por cartílago se forman en el borde de la articulación. A medida que aumenta el desgaste mecánico, el cartílago necesita reparación. Las células del cartílago no son capaces de producir suficiente matriz esponjosa y, por lo tanto, el cartílago dañado no puede repararse a sí mismo. El cartílago no tiene suministro de sangre para mejorar la curación. La mayoría de las artropatías degenerativas son el resultado de inestabilidades mecánicas o cambios de envejecimiento en la articulación. Esto incluye artropatía degenerativa en la vejez y, en individuos más jóvenes, puede ser el resultado de lesiones, contusiones, configuración anormal de las articulaciones (es decir, displasia de cadera) o desgaste mecánico de la ruptura del ligamento cruzado anterior, luxación rotuliana u osteocondritis disecante, por ejemplo. La artropatía degenerativa puede ocurrir en cualquier articulación del cuerpo, incluyendo sin limitación, rodilla, cadera, hombro, mano y columna vertebral.

Las terapias farmacéuticas convencionales para la artropatía degenerativa incluyen paracetamol, medicamentos antiinflamatorios no esteroideos (AINE), narcóticos y corticosteroides.

En el presente documento, se utiliza "tratar" para indicar la reducción (total o parcial) de los síntomas, la duración o la gravedad de una enfermedad.

La composición farmacéutica que comprende DA-DKP de la invención se administra a un animal que necesita tratamiento. Preferentemente, el animal es un mamífero, tal como un conejo, cabra, perro, gato, caballo o ser humano. Las cantidades de dosificación eficaces pueden variar según la gravedad de la enfermedad o afección, la(s) vía(s) de administración, la duración del tratamiento, la identificación de cualquier otro fármaco que se administre al animal, la edad, el tamaño y la especie del animal, y factores parecidos conocidos en las artes médicas y veterinarias.

Debido a que el tratamiento de la presente invención proporciona un efecto duradero sobre los síntomas de la artropatía degenerativa, un aspecto de la presente invención es que la composición que comprende DA-DKP puede administrarse a un animal a intervalos de tiempo más largos de lo esperado para terapias convencionales. Por ejemplo, la presente composición se puede administrar no más frecuentemente que una vez cada seis meses, una vez cada cinco meses, una vez cada cuatro meses, una vez cada tres meses, una vez cada dos meses, una vez cada mes, una vez cada cuatro semanas, una vez cada tres semanas, una vez cada dos semanas o una vez cada semana.

La composición de la presente invención que comprende DA-DKP puede administrarse a un paciente animal para terapia mediante cualquier vía de administración adecuada, incluyendo local, parenteral (por ejemplo, inyección, inyección intrarticular, intravenosa, intraespinal, intraperitoneal, subcutánea o intramuscular), transdérmica y tópica. Una vía de administración preferida es la inyección intrarticular.

La composición de la presente invención puede ser una solución farmacéutica que tiene un intervalo de concentración de DA-DKP con un criterio de valoración inferior de aproximadamente 10 mM, aproximadamente 20 mM, aproximadamente 30 mM, aproximadamente 40 mM, aproximadamente 50 mM, aproximadamente 60 mM, aproximadamente 70 mM, aproximadamente 80 mM, aproximadamente 90 mM, aproximadamente 100 mM, aproximadamente 110 mM, aproximadamente 120 mM, aproximadamente 130 mM, aproximadamente 140 mM, aproximadamente 150 mM, aproximadamente 160 mM, aproximadamente 170 mM, aproximadamente 180 mM, aproximadamente 190 mM, aproximadamente 200 mM, aproximadamente 210 mM, aproximadamente 220 mM, aproximadamente 230 mM, aproximadamente 240 mM, aproximadamente 250 mM, aproximadamente 260 mM, aproximadamente 270 mM, aproximadamente 280 mM, aproximadamente 290 mM, aproximadamente 300 mM, aproximadamente 310, aproximadamente 320 mM, aproximadamente 330 mM, aproximadamente 340 mM, aproximadamente 350 mM, aproximadamente 360 mM, aproximadamente 370 mM, aproximadamente 380 mM, aproximadamente 390 mM o aproximadamente 400 mM. La composición de la presente invención puede ser una solución farmacéutica que tiene un intervalo de concentración de DA-DKP con un criterio de valoración superior de aproximadamente 600 mM, aproximadamente 580 mM, aproximadamente 570 mM, aproximadamente 560 mM, aproximadamente 550 mM, aproximadamente 540 mM, aproximadamente 530 mM, aproximadamente 520 mM, aproximadamente 510 mM, aproximadamente 500 mM, aproximadamente 490 mM,

- aproximadamente 480 mM, aproximadamente 470 mM, aproximadamente 460 mM, aproximadamente 450 mM, aproximadamente 440 mM, aproximadamente 430 mM, aproximadamente 420 mM, aproximadamente 410 mM, aproximadamente 400 mM, aproximadamente 390 mM, aproximadamente 380 mM, aproximadamente 370 mM, aproximadamente 360 mM, aproximadamente 350, aproximadamente 340 mM, aproximadamente 330 mM, aproximadamente 320 mM, aproximadamente 310 mM, aproximadamente 300 mM, aproximadamente 290 mM, aproximadamente 280, aproximadamente 270 mM, aproximadamente 260 mM, aproximadamente 250 mM, aproximadamente 240 mM, aproximadamente 230 mM, aproximadamente 220 mM, aproximadamente 210 mM o aproximadamente 200 mM.
- 10 Una cantidad eficaz de DA-DKP en la composición de la presente invención para tratar una afección o artropatía degenerativa puede ser un intervalo con un criterio de valoración inferior de aproximadamente 10 mg, aproximadamente 15 mg, aproximadamente 20 mg, aproximadamente 25 mg, aproximadamente 30 mg, aproximadamente 35 mg, aproximadamente 40 mg, aproximadamente 45 mg, aproximadamente 50 mg, aproximadamente 55 mg, aproximadamente 60 mg, aproximadamente 65 mg, aproximadamente 70 mg,
- 15 aproximadamente 75 mg, aproximadamente 80 mg, aproximadamente 85 mg, aproximadamente 90 mg, aproximadamente 95 mg, aproximadamente 100 mg, aproximadamente 110 mg, aproximadamente 120 mg, aproximadamente 130 mg, aproximadamente 140 mg, aproximadamente 150 mg, aproximadamente 160 mg, aproximadamente 170 mg, aproximadamente 180 mg, aproximadamente 190 mg, aproximadamente 200 mg, aproximadamente 210 mg, aproximadamente 220 mg, aproximadamente 230 mg, aproximadamente 240 mg,
- 20 aproximadamente 250 mg, aproximadamente 260 mg, aproximadamente 270 mg, aproximadamente 280 mg, aproximadamente 290 mg, aproximadamente 300 mg, aproximadamente 310 mg, aproximadamente 320 mg, aproximadamente 330 mg, aproximadamente 340 mg, aproximadamente 350 mg, aproximadamente 360 mg, aproximadamente 370 mg, aproximadamente 380 mg, aproximadamente 390 mg, aproximadamente 400 mg, aproximadamente 425 mg, aproximadamente 450 mg, aproximadamente 475 mg o aproximadamente 500 mg.
- 25 Adicionalmente, una cantidad eficaz de DA-DKP en la composición de la presente invención para tratar una afección o artropatía degenerativa puede ser un intervalo con un criterio de valoración superior de aproximadamente 500 mg, aproximadamente 490 mg, aproximadamente 480 mg, aproximadamente 470 mg, aproximadamente 460 mg, aproximadamente 450 mg, aproximadamente 440 mg, aproximadamente 430 mg, aproximadamente 420 mg, aproximadamente 410 mg, aproximadamente 400 mg, aproximadamente 390 mg, aproximadamente 380 mg,
- 30 aproximadamente 370 mg, aproximadamente 360 mg, aproximadamente 350 mg, aproximadamente 340 mg, aproximadamente 330 mg, aproximadamente 320 mg, aproximadamente 310 mg, aproximadamente 300 mg, aproximadamente 290 mg, aproximadamente 280 mg, aproximadamente 270 mg, aproximadamente 260 mg, aproximadamente 250 mg, aproximadamente 240 mg, aproximadamente 230 mg, aproximadamente 220 mg, aproximadamente 210 mg, aproximadamente 200 mg, aproximadamente 190 mg, aproximadamente 180 mg,
- 35 aproximadamente 170 mg, aproximadamente 160 mg, aproximadamente 150 mg, aproximadamente 140 mg, aproximadamente 130 mg, aproximadamente 120 mg, aproximadamente 110 mg, aproximadamente 100 mg, aproximadamente 90 mg, aproximadamente 80 mg, aproximadamente 70 mg, aproximadamente 60 mg, aproximadamente 50 mg, aproximadamente 40 mg, aproximadamente 30 mg, o aproximadamente 20 mg.
- 40 Las formas de dosificación para la administración tópica o transdérmica de compuestos de la invención incluyen polvos, pulverizaciones, pomadas, pastas, cremas, lociones, geles, soluciones, parches y gotas. El principio activo se puede mezclar en condiciones estériles con un vehículo farmacéuticamente aceptable y con cualquier tampón o propelente que se requiera.
- 45 Las pomadas, pastas, cremas y geles pueden contener, además del principio activo, excipientes, tales como grasas animales y vegetales, aceites, ceras, parafinas, almidón, tragacanto, derivados de celulosa, polietilenglicoles, siliconas, bentonitas, ácido silícico, talco y óxido de cinc, o mezclas de los mismos.
- Los polvos y pulverizaciones pueden contener, además del principio activo, excipientes tales como lactosa, talco, ácido silícico, hidróxido de aluminio, silicatos cálcicos y polvo de poliamida, o mezclas de estas sustancias. Los aerosoles pueden contener además propelentes habituales, tales como clorofluorohidrocarburos e hidrocarburos volátiles no sustituidos, tales como butano y propano.
- 50 Los parches transdérmicos tienen la ventaja añadida de proporcionar administración controlada de compuestos de la invención al cuerpo. Dichas formas de dosificación se pueden preparar mediante disolución, dispersión o incorporación de otro modo de uno o más compuestos de la invención en un medio apropiado, tal como un material de matriz elastomérico. También se pueden usar potenciadores de la absorción para aumentar el flujo del compuesto a través de la piel. La velocidad de dicho flujo se puede controlar proporcionando una membrana controladora de velocidad o dispersando el compuesto en una matriz polimérica o gel.
- 55 Las composiciones farmacéuticas de la presente invención adecuadas para administraciones parenterales comprenden uno o más compuestos de la invención en combinación con una o más dispersiones, suspensiones, emulsiones o soluciones acuosas o no acuosas isotónicas estériles farmacéuticamente aceptables, o polvos estériles que se pueden reconstituir en soluciones o dispersiones inyectables solo antes de su uso, que pueden contener antioxidantes, tampones, solutos que hacen que la formulación sea isotónica con la sangre del destinatario pretendido o agentes de suspensión o espesantes.
- 60
- 65

Los ejemplos de vehículos acuosos y no acuosos adecuados que pueden emplearse en las composiciones farmacéuticas de la invención incluyen agua, etanol, polioles (tales como glicerol, propilenglicol, polietilenglicol y similares) y mezclas adecuadas de los mismos, aceites vegetales, tales como aceite de oliva y ésteres orgánicos inyectables, tales como oleato de etilo. La fluidez adecuada se puede mantener, por ejemplo, mediante el uso de materiales de recubrimiento, tal como lecitina, mediante el mantenimiento del tamaño de partícula necesario en caso de dispersiones, y mediante el uso de tensioactivos.

Estas composiciones también pueden contener adyuvantes tales como agentes humectantes, agentes emulsionantes y agentes dispersantes. También puede ser deseable incluir agentes isotónicos, tales como azúcares, cloruro sódico y similares en las composiciones. Además, la absorción prolongada de la forma inyectable del fármaco se puede llevar a cabo mediante la inclusión de agentes que retrasen la absorción, tales como monoestearato de aluminio y gelatina.

En algunos casos, con el fin de prolongar el efecto de un fármaco, es deseable ralentizar la absorción del fármaco mediante inyección subcutánea o intramuscular. Esto puede lograrse mediante el uso de una suspensión líquida de material cristalino o amorfo que tiene poca solubilidad en agua. La velocidad de absorción del fármaco depende por tanto de su velocidad de disolución que, a su vez, puede depender del tamaño del cristal y de la forma cristalina. Alternativamente, la absorción retardada de un fármaco administrado por vía parenteral se logra mediante la disolución o suspensión del fármaco en un vehículo oleoso.

Las formas de depósito inyectables se preparan mediante la formación de matrices microencapsuladas del fármaco en polímeros biodegradables tales como polilactida-poliglicólido. Dependiendo de la relación de fármaco a polímero y la naturaleza del polímero particular empleado, puede controlarse la velocidad de liberación del fármaco. Los ejemplos de otros polímeros biodegradables incluyen poli(ortoésteres) y poli(anhídridos). Las formulaciones inyectables de depósito también se preparan mediante el atrapamiento del fármaco en liposomas o microemulsiones que con compatibles con el tejido corporal. Los materiales inyectables se pueden esterilizar, por ejemplo, mediante filtración a través de un filtro de retención bacteriana.

Las formulaciones se pueden presentar en recipientes sellados de dosis unitaria o multidosis, por ejemplo, ampollas y viales, y se pueden almacenar en un estado liofilizado que requiere solo la adición del vehículo líquido estéril, por ejemplo, agua para inyección, inmediatamente antes de su uso. Se pueden preparar soluciones y suspensiones para inyección extemporáneas a partir de polvos, gránulos y comprimidos del tipo descrito anteriormente.

También se proporcionan kits que comprenden los productos farmacéuticos de la presente invención. Los kits pueden comprender una composición de DA-DKP formulada para administración mediante inyección. La DA-DKP se puede preparar como se describe en el presente documento, tal como mediante la eliminación de la albúmina de una solución de una composición de albúmina humana. Los kits pueden contener recipientes sellados de dosis unitaria o multidosis, por ejemplo, ampollas y viales, y se pueden almacenar en un estado liofilizado que requiere solo la adición del vehículo líquido estéril, por ejemplo, agua para inyección, inmediatamente antes de su uso. Los kits también pueden almacenarse en un estado en el que el contenido esté listo para uso directo o inyección.

Si bien es posible que un compuesto de la presente invención se administre solo, es preferible administrar el compuesto como una formulación farmacéutica (composición). Las composiciones farmacéuticas de la invención comprenden un compuesto o compuestos de la invención como principio activo en mezcla con uno o más vehículos farmacéuticamente aceptables y, opcionalmente, con uno o más de otros compuestos, fármacos u otros materiales. Cada vehículo debe ser "aceptable" en el sentido de ser compatible con los otros ingredientes de la formulación y no ser perjudicial para el animal. Los vehículos farmacéuticamente aceptables son bien conocidos en la técnica. Independientemente de la vía de administración seleccionada, los compuestos de la presente invención se formulan en formas de dosificación farmacéuticamente aceptables mediante métodos convencionales conocidos por los expertos en la técnica. Véase, por ejemplo, Remington's Pharmaceutical Sciences.

La composición de la presente invención puede comprender además N-acetil-triptófano (NAT), ácido caprílico, caprilato o combinaciones de los mismos. Preferentemente, la composición puede comprender NAT. Las composiciones de la presente invención que tienen NAT, ácido caprílico, caprilato o combinaciones de los mismos pueden ser una composición farmacéutica que tiene un intervalo de concentración de NAT, ácido caprílico, caprilato o combinaciones de los mismos con un criterio de valoración inferior de aproximadamente 1 mM, aproximadamente 2 mM, aproximadamente 3 mM, aproximadamente 4 mM, aproximadamente 5 mM, aproximadamente 6 mM, aproximadamente 7 mM, aproximadamente 8 mM, aproximadamente 9 mM, aproximadamente 10 mM, aproximadamente 11 mM, aproximadamente 12 mM, aproximadamente 13 mM, aproximadamente 14 mM, aproximadamente 15 mM, aproximadamente 16 mM, aproximadamente 17 mM, aproximadamente 18 mM, aproximadamente 19 mM o aproximadamente 20 mM. Además, las composiciones de la presente invención que tienen NAT, ácido caprílico, caprilato o combinaciones de los mismos pueden ser una composición farmacéutica que tiene un intervalo de concentración de NAT, ácido caprílico, caprilato o combinaciones de los mismos con un criterio de valoración superior de aproximadamente 40 mM, aproximadamente 39 mM, aproximadamente 38 mM, aproximadamente 37 mM, aproximadamente 36 mM, aproximadamente 35 mM, aproximadamente 34 mM, aproximadamente 33 mM, aproximadamente 32 mM, aproximadamente 31 mM, aproximadamente 30 mM,

aproximadamente 29 mM, aproximadamente 28 mM, aproximadamente 27 mM, aproximadamente 26 mM, aproximadamente 25 mM, aproximadamente 24 mM, aproximadamente 23 mM, aproximadamente 22 o aproximadamente 21 mM. Preferentemente, el intervalo de concentración es de aproximadamente 4 mM a aproximadamente 20 mM.

Además, la composición de la presente invención también puede comprender un segundo fármaco, tal como un analgésico (tal como lidocaína o paracetamol), un antiinflamatorio (tal como la betametasona, fármacos antiinflamatorios no esteroideos (AINE), paracetamol, ibuprofeno, naproxeno) y/u otros fármacos adecuados.

Los métodos para fabricar dicetopiperazinas, tales como DA-DKP, son bien conocidos en la técnica, y estos métodos pueden emplearse para sintetizar las dicetopiperazinas de la invención. Véase, por ejemplo, las Patentes de EE.UU. N.º 4.694.081, 5.817.751, 5.990.112, 5.932.579 y 6.555.543, la Publicación de Solicitud de Patente de EE.UU. número 2004/0024180, las solicitudes PCT WO 96/00391 y WO 97/48685 y Smith et al., Bioorg. Med. Chem. Letters, 8, 2369-2374 (1998).

Por ejemplo, las dicetopiperazinas, tales como DA-DKP, se pueden preparar mediante la síntesis primero de dipéptidos. Los dipéptidos se pueden sintetizar mediante métodos bien conocidos en la técnica usando L-aminoácidos, D-aminoácidos o una combinación de D- y L-aminoácidos. Se prefieren los métodos sintéticos de péptidos en fase sólida. Por supuesto, los dipéptidos también están disponibles comercialmente de numerosas fuentes, incluyendo DMI Synthesis Ltd., Cardiff, Reino Unido (síntesis personalizada), Sigma-Aldrich, St. Louis, Misuri (principalmente síntesis personalizada), Phoenix Pharmaceuticals, Inc., Belmont, California (síntesis personalizada), Fisher Scientific (síntesis personalizada) y Advanced ChemTech, Louisville, Kentucky.

Una vez que el dipéptido se sintetiza o compra, se cicla para formar una dicetopiperazina. Esto se puede lograr mediante una variedad de técnicas. Por ejemplo, la publicación de solicitud de patente de EE.UU. número 2004/0024180 describe un método para ciclar dipéptidos. Brevemente, el dipéptido se calienta en un disolvente orgánico mientras se elimina agua mediante destilación. Preferentemente, el disolvente orgánico es un azeótropo de bajo punto de ebullición con agua, tal como acetonitrilo, alcohol alílico, benceno, alcohol bencílico, n-butanol, 2-butanol, t-butanol, butiléster de ácido acético, tetracloruro de carbono, clorobenceno, cloroformo, ciclohexano, 1,2-dicloroetano, dietilacetil, dimetilacetil, etiléster de ácido acético, heptano, metilisobutilcetona, 3-pentanol, tolueno y xileno. La temperatura depende de la velocidad de reacción a la que tiene lugar la ciclación y del tipo de agente azeotrópico utilizado. La reacción se lleva a cabo preferentemente a 50-200 °C, más preferentemente 80-150 °C. El experto en la técnica puede determinar fácilmente el intervalo de pH en el que tiene lugar la ciclación. Ventajosamente será 2-9, preferentemente 3-7.

Cuando uno o ambos de los aminoácidos del dipéptido tiene, o se derivatiza para tener, un grupo carboxilo en su cadena lateral (por ejemplo, ácido aspártico o ácido glutámico), el dipéptido se cicla preferentemente como se describe en la Patente de EE.UU. N.º 6.555.543. Brevemente, el dipéptido, con el carboxilo de cadena lateral todavía protegido, se calienta en condiciones neutras. Normalmente, el dipéptido se calentará de aproximadamente 80 °C a aproximadamente 180 °C, preferentemente a aproximadamente 120 °C. El disolvente será un disolvente neutro. Por ejemplo, el disolvente puede comprender un alcohol (tal como butanol, metanol, etanol y alcoholes superiores, pero no fenol) y un codisolvente azeotrópico (tal como tolueno, benceno o xileno). Preferentemente, el alcohol es butan-2-ol, y el codisolvente azeotrópico es tolueno. El calentamiento continúa hasta que se completa la reacción, y dichos tiempos se pueden determinar empíricamente. Normalmente, el dipéptido se ciclará mediante reflujo durante aproximadamente 8-24 horas, preferentemente aproximadamente 18 horas. Finalmente, el grupo protector se elimina de la dicetopiperazina. Al hacerlo, se debe evitar el uso de ácidos fuertes (ácidos minerales, tales como ácidos sulfúricos o clorhídricos), bases fuertes (bases alcalinas, tales como hidróxido de potasio o hidróxido de sodio) y agentes reductores fuertes (por ejemplo, hidruro de litio y aluminio), para mantener la quiralidad del compuesto final.

Los dipéptidos elaborados con resinas en fase sólida se pueden ciclar y liberar de la resina en un solo paso. Véase, por ejemplo, la patente de EE.UU. N.º 5.817.751. Por ejemplo, la resina que tiene un dipéptido N-alquilado unido se suspende en tolueno o tolueno/etanol en presencia de ácido acético (por ejemplo, 1 %) o trietilamina (por ejemplo, 4 %). Normalmente, se prefieren las condiciones básicas de ciclación por sus tiempos de ciclación más rápidos.

Otros métodos para ciclar dipéptidos y para preparar dicetopiperazinas son conocidos en la técnica y se pueden usar en la preparación de dicetopiperazinas útiles en la práctica de la invención. Véase, por ejemplo, la bibliografía enumerada anteriormente. Además, muchas dicetopiperazinas adecuadas para usar en la presente invención se pueden preparar como se describe a continuación a partir de proteínas y péptidos. Adicionalmente, las dicetopiperazinas para usar en la práctica de la invención se pueden obtener comercialmente de, por ejemplo, DMI Synthesis Ltd., Cardiff, Reino Unido (síntesis personalizada).

La composición y/o los productos de DA-DKP de la presente invención se pueden preparar a partir de soluciones que contienen DA-DKP, incluyendo a partir de las composiciones farmacéuticas disponibles comercialmente que comprenden albúmina, tales como seroalbúmina humana, mediante métodos bien conocidos, tales como ultrafiltración, cromatografía (cromatografía de exclusión por tamaño (por ejemplo, filtración Centricon), cromatografía de afinidad (por ejemplo, usando una columna de perlas que tienen unido un anticuerpo o anticuerpos dirigidos a la(s)

dicetopiperazina(s) deseada(s) o un anticuerpo o anticuerpos dirigidos a la proteína o péptido truncado), intercambio aniónico o intercambio catiónico), centrifugación en gradiente de sacarosa, cromatografía, precipitación salina o sonicación, que eliminará parte o la totalidad de la albúmina en la solución. La composición y/o producto que contiene DA-DKP resultante se puede usar e incorporar en composiciones farmacéuticas como se describió anteriormente.

Usando un método de separación por ultrafiltración, se puede pasar una composición de seroalbúmina humana sobre una membrana de ultrafiltración que tiene un límite de peso molecular que retiene la albúmina mientras la DA-DKP pasa al filtrado o fracción resultante. Este filtrado puede comprender componentes que tienen pesos moleculares de menos de aproximadamente 50 kDa, menos de aproximadamente 40 kDa, menos de 30 kDa, menos de aproximadamente 20 kDa, menos de aproximadamente 10 kDa, menos de aproximadamente 5 kDa, menos de aproximadamente 3 kDa. Preferentemente, el filtrado comprende componentes que tienen pesos moleculares de menos de aproximadamente 5 Da (también denominado "de PM < 5000"). Esta fracción o filtrado de PM < 5000 contiene DA-DKP que se forma después de que el dipéptido aspartato-alanina se escinde de la albúmina y posteriormente se cicla en la dicetopiperazina.

Las sales fisiológicamente aceptables de la DA-DKP de la invención también se pueden usar en la práctica de la invención. Las sales fisiológicamente aceptables incluyen sales no tóxicas convencionales, tales como sales procedentes de ácidos inorgánicos (tales como clorhídrico, bromhídrico, sulfúrico, fosfórico, nítrico y similares), ácidos orgánicos (tales como ácido acético, propiónico, succínico, glicólico, esteárico, láctico, málico, tartárico, cítrico, glutámico, aspártico, benzoico, salicílico, oxálico, ascórbico y similares) o bases (tales como el hidróxido, carbonato o bicarbonato de un catión metálico farmacéuticamente aceptable o cationes orgánicos procedentes de N,N-dibenciletilendiamina, D-glucosamina o etilendiamina). Las sales se preparan de manera convencional, por ejemplo, mediante la neutralización de la forma de base libre del compuesto con un ácido.

Como se usa en el presente documento, "un" o "uno/una" significa uno/una o más.

Como se usa en el presente documento, "comprende" y "que comprende" incluyen dentro de su alcance todos los términos más específicos, tales como "que consiste esencialmente en" y "que consiste en" como realizaciones alternativas de la presente invención caracterizadas en el presente documento por "comprende" o "que comprende".

Con respecto al uso de "que consiste esencialmente en", esta frase limita el alcance de una reivindicación de las etapas y materiales especificados y aquellos que no afectan materialmente las características básicas y novedosas de la invención divulgada en el presente documento.

Objetos adicionales, ventajas y características novedosas de la presente invención resultarán evidentes para los expertos en la materia al considerar los siguientes ejemplos no limitantes. Los siguientes resultados experimentales se proporcionan con fines de ilustración y no se pretende que limiten el alcance de la invención.

## Ejemplos

### Ejemplo 1

Se realizó un ensayo clínico para investigar el efecto de una inyección intrarticular en rodilla de una fracción de PM < 5000 de seroalbúmina humana (también denominada en el presente documento "Ampion™") para mejorar la función articular y reducir el dolor de la artrosis de la rodilla. Se eligió un estudio aleatorizado, controlado con placebo, doble ciego, paralelo con 60 sujetos evaluables como el diseño apropiado para estimar el efecto y la seguridad del tratamiento de la fracción de PM < 5000 cuando se inyectó en la rodilla de estudio.

#### Objetivo principal:

Investigar la reducción del dolor en sujetos con artrosis de rodilla con una sola inyección intrarticular de 10 ml que contiene la fracción de PM < 5000 combinada con suspensión de lidocaína/betametasona en comparación con la fracción de PM < 5000 combinada con suspensión de betametasona o en comparación con un placebo de solución salina combinado con suspensión de lidocaína/betametasona.

#### Objetivos secundarios:

Investigar la función y el dolor articular en sujetos con artrosis de rodilla, según lo evaluado por el índice de artrosis de la Universidad de Western Ontario McMaster (WOMAC, de sus siglas en inglés) (Bellamy et al., "Validation study of WOMAC: a health status instrument for measuring clinically important patient relevant outcomes to antirheumatic drug therapy in patients with osteoarthritis of the hip or knee". J Rheumatology 1988; 15:1833-1840) de una inyección intrarticular única de la fracción de PM < 5000 combinada con suspensión de lidocaína/betametasona en comparación con la fracción <5000 PM combinada con suspensión de betametasona o en comparación con un placebo de solución salina combinado con suspensión de lidocaína/betametasona.

Investigar el requerimiento de medicamentos de rescate en sujetos con artrosis de rodilla, después de una inyección intrarticular única de la fracción de PM < 5000 combinada con suspensión de lidocaína/betametasona en comparación



con la fracción < 5000 PM combinada con suspensión de betametasona o en comparación con un placebo de solución salina combinado con suspensión de lidocaína/betametasona.

- 5 Investigar el efecto sobre la amplitud de movimiento en sujetos con artrosis de rodilla y la amplitud de movimiento limitada en la rodilla de estudio debido al dolor y la inflamación, después de una inyección intrarticular única de la fracción de PM < 5000 combinada con suspensión de lidocaína/betametasona en comparación con la fracción de PM < 5000 combinada con suspensión de betametasona o en comparación con un placebo de solución salina combinado con suspensión de lidocaína/betametasona.
- 10 Comparar la seguridad y la tolerabilidad entre tratamientos según lo evaluado mediante los acontecimientos adversos informados en la población de estudio.

#### Descripción del protocolo

- 15 Este estudio fue un estudio aleatorizado, controlado con placebo, doble ciego, paralelo diseñado para evaluar el efecto de la inyección intrarticular en la rodilla de la fracción de PM < 5000 en sujetos de sexo masculino o femenino ≥ 40 años con artrosis primaria sintomática en rodilla durante 6 meses antes de la exploración. El estudio consistió en un período de exploración de 3 semanas y un período de participación en el estudio de 4 días. Cada sujeto se asignó al azar para recibir una sola inyección en la rodilla de 10 ml de uno de los siguientes:

20 la fracción de PM < 5000 combinada con suspensión de lidocaína/betametasona

la fracción de PM < 5000 combinada con suspensión de betametasona

25 placebo de solución salina combinado con suspensión de lidocaína/betametasona

A los sujetos se les permitió salir de la clínica después de una revisión satisfactoria posterior a la dosis por parte del investigador. Las evaluaciones de seguimiento se realizaron a las 6 horas, 24 horas (día 2) y 72 horas (día 4) después de la inyección. Estas evaluaciones se realizaron en la clínica o externamente (por ejemplo, visita domiciliaria), a discreción del investigador.

#### Duración de la participación en el estudio:

35 Exploración: Entre el día - 21 y el día - 1.

Periodo de tratamiento: Una inyección única en la rodilla de estudio con seguimiento clínico durante 72 horas, incluyendo la dosificación en el día 1 y las visitas de seguimiento en el día 2 y el día 4.

40 La duración total de la participación en el estudio fue de aproximadamente 72 horas para cada sujeto, con un intervalo de exploración de hasta 21 días.

#### Tratamientos de estudio

Cada sujeto recibió una inyección única de 10 ml en una rodilla de uno de los siguientes tratamientos:

- 45 Fracción de PM < 5000 combinada con suspensión de lidocaína/betametasona  
Fracción de PM < 5000 combinada con suspensión de betametasona  
placebo de solución salina combinado con suspensión de lidocaína/betametasona

#### Población de estudio

La población de estudio fue de 60 pacientes, de sexo masculino o femenino, de 40 a 85 años de edad, totalmente ambulatorios, con artrosis primaria sintomática de rodilla durante más de 6 meses antes de la exploración con Kellgren Lawrence grado II o III.

#### Descripción del producto en investigación

60 Se preparó una fracción de PM < 5000 estéril de 2 ml en frascos de almacenamiento con tapón de goma por Sypharma Pty Ltd., Dandenong, Victoria, Australia. La fracción de PM < 5000 se combinó con suspensión de lidocaína/betametasona o suspensión de betametasona de forma ciega antes de la inyección. Se administró placebo de solución salina combinado con suspensión de lidocaína/betametasona como tercer tratamiento. Véase la Tabla 1

**Tabla 1 Componentes del producto en investigación:**

	Fracción de PM < 5000	Betametasona	Lidocaína	Solución salina
Tratamiento A	4 ml	2 ml	4 ml	Nulo
Tratamiento B	4 ml	2 ml	Nulo	4 ml
Tratamiento C	Nulo	2 ml	4 ml	4 ml

- 5 Se inyectó una inyección única de 10 ml del fármaco de estudio combinada con suspensión de lidocaína/betametasona o combinada con suspensión de betametasona en el espacio de la articulación de la rodilla en condiciones de preparación estériles usando una aguja de calibre 18-21.

- 10 El fármaco de estudio se almacenó a temperatura ambiente (59 ° - 77 °F o 15 ° - 25 °C) en un área segura con acceso restringido.

#### Aleatorización y asignación para el tratamiento de estudio

- 15 Los sujetos se asignaron a un tratamiento numerado secuencialmente de acuerdo con el programa de aleatorización después de la confirmación de elegibilidad en la dosis previa. Cada sujeto fue asignado a uno de los tres tratamientos, es decir, fracción activa de PM < 5000 (ya sea combinada con suspensión de lidocaína/betametasona o de betametasona) o placebo de solución salina combinado con lidocaína/betametasona. La asignación del tratamiento se realizó mediante un algoritmo de aleatorización en bloque.

- 20 Si ambas rodillas tenían artrosis, entonces, en la exploración el investigador seleccionó una rodilla para ser la rodilla de estudio, siendo la rodilla que mejor satisfizo los requisitos para el estudio. En el momento de la administración de la dosis, la rodilla de estudio recibió un producto en investigación de acuerdo con el esquema de aleatorización. La otra rodilla recibió el tratamiento de referencia normal.

#### Medidas de eficacia

- 30 La amplitud de movimiento en la rodilla de estudio se examinó por el investigador o el candidato para sujetos con una amplitud de movimiento limitada debido al dolor y la inflamación antes de la dosis, 24 y 72 horas después de la dosis y se realizó la evaluación global del dolor (escala de puntuación numérica del dolor) antes de la dosis, 6, 24 y 72 horas después de la dosis y los sujetos completaron el índice 3.1 de artrosis de la Universidad de Western Ontario McMaster (WOMAC) antes de la dosis, 24 y 72 horas después de la dosis.

- 35 La escala de puntuación numérica (NRS) del dolor en la rodilla de estudio se completó antes de la dosis, 6 horas después de la dosis en el día 1, 24 horas después de la dosis en el día 2 y 72 horas después de la dosis en el día 4. La escala de puntuación numérica del dolor se completó antes de WOMAC si la escala de dolor y WOMAC se producen al mismo tiempo. La NRS del dolor es una puntuación numérica de 0-10, siendo 0 sin dolor, 5 con dolor moderado y 10 con el peor dolor posible.

- 40 La amplitud de movimiento (grados de flexión y extensión) en la rodilla de estudio se examinó por el investigador o el candidato para sujetos con una amplitud de movimiento limitada debido al dolor y la inflamación, no por el crecimiento de osteófitos, al inicio, 24 horas después de la dosis en el día 2 y 72 horas después de la dosis en el día 4.

- 45 El índice WOMAC 3.1 se completó por los sujetos dentro de 1 hora antes de la inyección, 24 horas después de la dosis en el día 2 y 72 horas después de la dosis en el día 4. El índice WOMAC evalúa la función articular y el dolor en sujetos con artrosis de cadera o rodilla. Mide 24 parámetros (preguntas) siendo cada parámetro (pregunta) calificado por el sujeto en una escala de 1-10. Hay tres subpuntuaciones: dolor (5 preguntas); rigidez (2 preguntas); y función (17 preguntas).

- 50 Los datos se analizaron mediante la prueba t de Student: diferencia de medias (DE) entre los grupos de tratamiento A y C para lo siguiente:

- Cambio de la media en NRS del dolor a las 6 horas, 24 horas y 72 horas (Figura 1);
- Cambio en la media en subpuntuaciones WOMAC del dolor a las 24 horas y 72 horas (Figuras 3A y 3B);
- Cambio en la media en subpuntuaciones WOMAC de función a las 24 horas y 72 horas (Figuras 5A y 5B); y
- Cambio en la media en subpuntuaciones WOMAC de rigidez a las 24 horas y 72 horas (Figuras 4A y 4B).

Además, se calcularon medidas ANOVA repetidas: diferencia de medias (DE) entre los grupos de tratamiento A y C para el cambio de la media en NRS del dolor con el tiempo (Figura 2).

## Resultados

Los resultados se presentan en las Figuras 1-6, Tablas 2 y 3 y se resumen aquí:

- 5 • Se observó una tendencia a la mejora en NRS del dolor con la Fracción de PM < 5000 (Ampion™). Esta tendencia aumentó con el tiempo frente a los esteroides y demuestra que los efectos de la Fracción de PM < 5000 son duraderos.
- WOMAC - no se observaron diferencias en las tres subpuntuaciones analizadas.
- La fracción de PM < 5000 no aumenta los acontecimientos adversos.
- 10 • Los datos sobre medicamentos de rescate y la amplitud de movimiento solo se recopilaron en un pequeño porcentaje de pacientes y no se analizaron.
- La posible evolución temporal de esteroides se muestra en la Figura 6. El inicio de la eficacia de los esteroides es rápido: el efecto máximo de 12-24 horas se alcanza en 1 semana y dura 4 semanas (Ann Rheum Dis 2004; 63:478-482). El dolor a corto plazo aumenta desde el inicio hasta el día 3 y disminuye después (Am J Orthop. marzo de 2007; 36(3): 128-31).
- 15

**Tabla 2 Variables de eficacia de valores iniciales, media (DE)**

Variable de eficacia	Ampion™ + Esteroide + lidocaína	Eesteroide + lidocaína	Valor p de la prueba t
NRS el dolor	4,29 (2,28)	3,61 (1,69)	0,32
WOMAC del dolor	4,09 (1,95)	3,99 (2,07)	0,91
WOMAC de rigidez	3,86 (1,78)	3,93 (2,05)	0,54
WOMAC de función	5,15 (2,10)	4,69 (2,26)	0,89
Ampion + Esteroide + lidocaína: n = 20, población de seguridad; n = 17, población de análisis de eficacia con esteroide + lidocaína: n = 20, población de seguridad; n = 18, población de análisis de eficacia			

**Tabla 3 Cambio de la media en NRS del dolor, media (DE)**

Tiempo	Ampion™ + Esteroide + lidocaína	Eesteroide + lidocaína	Valor p de la prueba t
6 horas	-2,31 (2,36)	-2,06 (1,86)	0,73
24 horas	-2,12 (1,58)	-1,61 (2,15)	0,43
72 horas	-2,50 (1,83)	-1,82 (1,74)	0,30

## Ejemplo 2

Se realizó un ensayo clínico para investigar el efecto de la inyección intrarticular en la rodilla de la Fracción de PM < 5000 (también denominada en el presente documento "Ampion™") para mejorar la función articular y reducir el dolor de la artrosis de rodilla en adultos con artrosis primaria sintomática de rodilla. Se eligió un estudio aleatorizado, controlado con placebo, doble ciego, paralelo con 43 sujetos evaluables como el diseño apropiado para estimar el efecto y la seguridad del tratamiento de la fracción de PM < 5000 cuando se inyectó en la rodilla de estudio.

### Fármaco de estudio

2 grupos; cada sujeto recibió una inyección única de 4 ml en una rodilla con uno de Ampion™ o solución salina.

### Población de estudio

La población de estudio fue de 43 pacientes, de sexo masculino o femenino de 40-83 años de edad (media 63,0, desviación estándar (DE) 9,6), 28 eran de sexo masculino y 15 de sexo femenino. Todos los sujetos eran caucásicos. La altura de los sujetos varió entre 162 y 192 cm (media 175,3, DE 8,1) con un peso en la exploración que varía de 56 a 117 kg (media 88,8, DE 13,89). Los sujetos fueron completamente ambulatorios, con artrosis primaria sintomática de rodilla durante más de 6 meses antes de la exploración con Kellgren Lawrence Grado II o III (lo que indica artrosis leve o moderada). Grado II para 6 sujetos y Grado III para 36 sujetos. Un sujeto tenía Grado IV. Si ambas rodillas de un sujeto eran artríticas, se seleccionó una rodilla para estudio mientras que la otra rodilla recibió tratamiento de referencia normal.

### Criterios de exclusión:

Los siguientes son los criterios de exclusión para la población de estudio:

1. No apto como resultado de una revisión médica y una exploración de detección
2. Antecedentes de reacciones alérgicas a la albúmina
3. Antecedentes de reacciones alérgicas a excipientes en albúmina humana al 5 %
4. Cualquier inyección intrarticular o periarticular local, inyección o cirugía en la rodilla de referencia (6 meses anteriores)

5. Artroscopia quirúrgica (3 meses previos)
6. Procedimiento quirúrgico de la rodilla de referencia que no sea artroscopia (12 meses anteriores)
7. Cualquier producto de investigación para la rodilla (12 meses anteriores)
8. Artrosis de rodilla de grado I o IV de Kellgren Lawrence (dudoso o grave).
9. Artropatías inflamatorias o cristalinas, fracturas agudas, pérdida grave de densidad ósea, necrosis ósea.
10. Síndrome femororrotuliano aislado o condromalacia.
11. Cualquier otra enfermedad o afección que interfiera con el uso y la evaluación libre de la rodilla de referencia
12. Lesión grave en la referencia (12 meses anteriores)
13. Artrosis grave de cadera ipsilateral a la rodilla de referencia.
14. Cualquier dolor que pueda interferir con la evaluación del dolor de rodilla de referencia
15. Cualquier tratamiento farmacológico o no farmacológico iniciado o modificado (4 semanas anteriores)
16. Uso de a. cualquier tratamiento tópico (48 h previas), b. Todos los analgésicos y AINE excepto el paracetamol (48 h previas), c. Terapia anticoagulante (48 h previas), d. Cualquier tratamiento con esteroides sistémicos (14 días previos), e. Todos los inmunosupresores dentro de un período de 5 veces la semivida del fármaco antes de la aleatorización, f. corticosteroides > 10 mg de prednisona equivalente por día (30 días previos), g. Cualquier tratamiento de albúmina (3 meses previos)
17. Sujetos de sexo femenino que están embarazadas o lactantes.
18. Sujetos de sexo femenino en edad fértil que tienen una prueba de embarazo positiva el día 1 antes del tratamiento.

#### Evaluación de estudio

El estudio consistió en un período de exploración de tres semanas y un período de participación en el estudio de 84 días. Las evaluaciones de seguimiento se realizaron a las 6 horas, 24 horas y 72 horas después de la inyección. Los sujetos se localizaron por teléfono los días 8, 30 y 84 para evaluar el dolor y la movilidad en general y para controlar los acontecimientos adversos. Se ofreció a los sujetos la opción de una inyección intrarticular de betametasona en la rodilla de investigación para aliviar el dolor después del día 8, si se consideraba necesario después de una evaluación por parte del investigador.

#### Resultado principal

La escala de puntuación numérica (NRS) del dolor en la rodilla de estudio se completó antes de la dosis (valores iniciales previos a la inyección), 6 horas después de la dosis en el día 1, 24 horas después de la dosis en el día 2 y 72 horas después de la dosis en el día 4, y el día 8, día 30 y día 84 después de la dosis (FDE o fin de estudio). La NRS del dolor es una puntuación numérica de 0-10, siendo 0 sin dolor, 5 con dolor moderado y 10 con el peor dolor posible.

#### Criterio de valoración de seguridad

Los criterios de valoración de seguridad del estudio fueron la incidencia de acontecimientos adversos, signos vitales previos a la dosis y el día 4 del estudio, lecturas de ECG de doce derivaciones en la exploración y 24 horas después de la dosis, y pruebas clínicas de seguridad de la sangre (bioquímica y hematológica) evaluadas en la exploración y 24 horas después de la dosis.

#### Criterios de valoración secundarios

Los criterios de valoración secundarios del estudio fueron los porcentajes de respuesta en el día 30 y el día 84, definidos como una mejora en NRS del dolor de 2 o más puntos, el cambio con respecto al valor inicial previo a la inyección en el índice de artrosis WOMAC 3.1 (escala completa, subpuntuación del dolor, subpuntuación de rigidez y subpuntuación de función) a las 24 y 72 horas después de la inyección intrarticular, el cambio con respecto al valor inicial previo a la inyección para el requerimiento de medicamentos de rescate (paracetamol) a las 24 horas y 72 horas después de la inyección intrarticular y cambios a lo largo del tiempo en la movilidad en el día 8, día 30 y día 84 después de la dosis en comparación con la dosis previa y el período inmediato posterior a la dosis.

#### Intención de tratamiento (ITT) y población de seguridad

Los participantes del estudio que fueron asignados al azar y recibieron al menos una dosis de la medicación del estudio. ITT se refiere a sujetos que cumplieron con los criterios de inclusión/exclusión.

#### Población de acuerdo al protocolo

Los participantes del estudio en el conjunto de ITT cuya puntuación del dolor previo a la dosis no violó los criterios de inclusión/exclusión.

#### Población de eficacia

Participantes del estudio en la población previa al protocolo que no recibieron medicación de rescate entre 8 y 30 días.

### Análisis estadístico

Principal: Modelo de análisis de covarianza (ANCOVA) para examinar la diferencia media (DE) entre los grupos de tratamiento para el cambio de la media en el dolor en el día 30 y el día 84 (FDE), ajustado para NRS del dolor inicial.

Adicional: Prueba  $X^2$  para diferencias en porcentajes de sujetos que responden al tratamiento. Prueba de tendencia de Cochran-armitage para diferencias en mejoras clínicamente significativas. Test de la t de Student: diferencia de medias (DE) en NRS del dolor a los 30 días.

### Análisis de seguridad:

Los acontecimientos adversos y los acontecimientos adversos graves se enumeraron por sujeto. Los sumarios se presentaron mediante el tratamiento de los acontecimientos adversos clasificados mediante la MedDRA System Organ Class and Preferred Term, para la incidencia general y por la gravedad y la relación con la medicación del estudio. La incidencia de acontecimientos adversos emergentes del tratamiento se comparó entre los grupos de tratamiento. Todos los datos clínicos de seguridad y tolerabilidad se enumeraron para cada sujeto y se resumieron por tratamiento. Los signos vitales y los parámetros de ECG se tabularon y resumieron por tratamiento. Se enumeraron los valores de laboratorio, junto con comentarios sobre la significación clínica de los valores fuera de los intervalos normales de laboratorio. Los cambios de la exploración se evaluaron para determinar su significación clínica.

### Resultados:

**Tabla 4 Población**

Conjunto de análisis	Tamaño del estudio (n)	Ampion™ (n)	Solución salina (n)
Conjunto de seguridad	43	22	21
Conjunto ITT	43	22	21
Conjunto por protocolo <sup>a</sup>	41	20	21
Conjunto de análisis de eficacia	32	17	15

<sup>a</sup>: 2 sujetos en el grupo Ampion™ tenían NRS del dolor inicial < 4 puntos  
<sup>b</sup>: 5 sujetos en el grupo Ampion™ y 6 sujetos en el grupo de solución salina requirieron medicación de rescate

### Uso de medicamentos de rescate

Inyección de betametasona: no hubo diferencias aparentes entre el uso de inyecciones de betametasona entre los sujetos que recibieron Ampion™ (5 de 22 sujetos, 23 %) en comparación con los sujetos que recibieron solución salina (6 de 21 sujetos, 29 %).

Medicamentos de rescate (paracetamol): los medicamentos de rescate para el alivio del dolor en la rodilla de estudio dentro de las 24 horas posteriores a la inyección ocurrieron en un número similar de sujetos que recibieron Ampion™ (6 de 22 sujetos) en comparación con los sujetos que recibieron solución salina (6 de 21 sujetos), con dosis medias similares de paracetamol utilizadas en cada uno de los grupos de tratamiento.

### Resultados de eficacia:

**Tabla 5 NRS de dolor por tratamiento, población media (DE) previa al protocolo:**

Tratamiento	Dosis previa	6 h después de la dosis	24 h después de la dosis	72 h después de la dosis	Día 8 después de la dosis	Día 30 después de la dosis	Día 84 después de la dosis
Ampion™	4,70 (0,7)	2,00 (1,3)	3,20 (1,5)	2,60 (2,1)	2,90 (2,1)	2,90 (1,8)	3,21 (1,8)
Solución salina	5,29 (1,4)	2,67 (1,9)	3,00 (1,7)	2,86 (2,1)	3,33 (1,9)	3,86 (2,2)	4,81 (2,3)

**Tabla 6 Cambio de la media de mínimos cuadrados (MC) en NRS del dolor: población por protocolo**

Tratamiento	6 h después de la dosis	24 h después de la dosis	72 h después de la dosis	Día 8 después de la dosis	Día 30 después de la dosis	Día 84 después de la dosis
D (Ampion™)	-3,06	-1,69	-2,31	-2,00	-2,16	-1,60
E (Solución salina)	-2,28	-2,11	-2,22	-1,76	-1,09	-0,36
Valor de P	0,15	0,42	0,89	0,71	0,12	0,07
Escala: -10 = la mejoría más grande posible en el dolor desde los valores iniciales, 10 = la mejoría más pequeña posible (mayor aumento) en el dolor desde los valores iniciales. Día 1: 6 horas después de la dosis * ajustado para NRS del dolor inicial						

**Tabla 7 Cambio de la media de los MC en NRS del dolor: población de análisis de eficacia**

Tratamiento	6 h después de la dosis	24 h después de la dosis	72 h después de la dosis	Día 8 después de la dosis	Día 30 después de la dosis	Día 84 después de la dosis
D (Ampion™)	-2,91	-1,99	-2,94	-2,45	-2,29	-2,22
E (Solución salina)	-2,62	-2,61	-2,79	-2,22	-1,17	-0,46
Valor de P	0,62	0,19	0,79	0,71	0,19	0,04
Escala: -10 = la mejoría más grande posible en el dolor desde los valores iniciales, 10 = la mejoría más pequeña posible (mayor aumento) en el dolor desde los valores iniciales. Día 1: 6 horas después de la dosis * ajustado para NRS del dolor inicial						

- 5 Porcentaje de sujetos que responden al tratamiento en el día 84 (FDE): población por protocolo (véase la Tabla 8)

Sujeto que responde al tratamiento: disminución en NRS del dolor en el día 84 de -2 a -10 puntos (siendo -10 la mayor mejora posible en el dolor).

- 10 Sujeto que no responde al tratamiento: disminución del dolor en el día 84 de -1 a 10 (siendo 10 el mayor aumento posible del dolor).

**Tabla 8 Tendencias en el dolor a los 30 días desde los valores iniciales, por grupo de tratamiento:**

Tratamiento	Sujeto que no responde al tratamiento	Sujeto que responde al tratamiento	Valor de P
Ampion™	47,4 %	52,6 %	0,06
Solución salina	76,2 %	23,8 %	

- 15 Porcentaje de sujetos que responden al tratamiento en el día 84 (FDE): población de análisis de eficacia (véase la Tabla 9) Sujeto que responde al tratamiento: disminución en NRS del dolor en el día 84 de -2 a -10 puntos (siendo -10 la mayor mejora posible en el dolor).

- 20 Sujeto que no responde al tratamiento: disminución del dolor en el día 84 de -1 a 10 puntos (siendo 10 el mayor aumento posible del dolor).

**Tabla 9 Tendencias en el dolor a los 30 días desde los valores iniciales, por grupo de tratamiento:**

Tratamiento	Sujeto que no responde al tratamiento	Sujeto que responde al tratamiento	Valor de P
Ampion™	35,7 %	64,3 %	0,10
Solución salina	66,7 %	33,3 %	

#### Sumario de resultados: Eficacia:

- 25 El dolor general (según lo evaluado por la escala de puntuación numérica del dolor) y las puntuaciones de WOMAC se redujeron después de la dosis para cada uno de los grupos de tratamiento durante la duración del estudio ( $p < 0,05$ ), excepto el placebo en el día 84. Además, hubo una tendencia a una diferencia significativa entre los cambios desde los valores iniciales en el día 30 y en el día 84 para los sujetos que recibieron Ampion™ en comparación con los sujetos que recibieron placebo de solución salina (Día 30:  $p = 0,12$ ; día 84:  $p = 0,07$ ). Esta tendencia se volvió estadísticamente significativa en los sujetos que no recibieron medicación de rescate ( $p = 0,04$ ). Hubo una tendencia hacia un mayor porcentaje de sujetos que respondieron al tratamiento al final del estudio (Día 84) para los sujetos que recibieron Ampion™ frente a placebo ( $p = 0,06$ ). El uso de medicación de rescate de paracetamol hasta 72 horas después de la dosis fue mayor en el grupo de Tratamiento E (solución salina). Véase la Figura 7.

- 35 Acontecimientos adversos (AA)

Se informaron AA surgidos durante el tratamiento para 20 de los 43 sujetos (47 %) después de la administración de la dosis, con un total de 27 AA. Los AA más frecuentes fueron dolor de cabeza e inflamación articular y rigidez en la rodilla. La mayoría de los sujetos informaron AA clasificados solo como leves (16 de 43 sujetos, 37 %). Solo 4 sujetos

5 (9 %) informaron AA de gravedad moderada:

- Ampion™: Lesión articular e hipertensión
- Solución salina: Dolor de espalda y hematoma en el sitio de punción vascular

10 No hubo diferencias aparentes en la incidencia de AA moderados entre los sujetos que recibieron Ampion™ (2 sujetos, 9 %) en comparación con los sujetos que recibieron solución salina (2 sujetos, 10 %). Todos estos AA se consideraron probablemente no relacionados o definitivamente no relacionados con el fármaco de estudio.

No hubo AA clasificados como graves.

15 Los AA considerados relacionados con la administración del fármaco de estudio (posiblemente) se informaron en 3 de 43 sujetos (7 %). No hubo diferencias aparentes en la incidencia de AA relacionados entre los sujetos que recibieron Ampion™ (1 sujeto, 5 %) en comparación con los sujetos que recibieron solución salina (2 sujetos, 10 %):

- 20 a. Dolor de cabeza de gravedad leve que comenzó 5 minutos después de la administración del tratamiento y se resolvió 1,8 horas después (Ampion™)
- b. Dolor de cabeza de gravedad leve que comenzó 5 horas después de la administración del tratamiento y se resolvió 0,5 horas después (solución salina)
- 25 c. Hinchazón articular de la rodilla derecha (rodilla de estudio) de gravedad leve que comenzó 2,4 días después de la administración del tratamiento y se resolvió 21 horas después (solución salina)

En general, se informó una mayor proporción de AA surgidos durante el tratamiento en sujetos que recibieron solución salina (12 sujetos, 57 %) en comparación con los sujetos que recibieron Ampion™ (8 sujetos, 36 %). Los AA considerados relacionados con la administración del fármaco de estudio (posiblemente) se informaron en 3 de 43 sujetos (7 %) e incluyeron dolor de cabeza e hinchazón articular de la rodilla. No hubo muertes ni otros AA graves. No hubo diferencias claras en la seguridad según lo evaluado mediante pruebas bioquímicas de laboratorio clínico, signos vitales y evaluaciones de ECG entre tratamientos.

#### 35 Conclusiones del estudio:

El dolor (según lo evaluado por la escala de puntuación numérica del dolor) y las puntuaciones de WOMAC se redujeron después de la dosis para cada uno de los grupos de tratamiento durante el estudio, excepto el placebo en el día 84, sin diferencias significativas entre los grupos de tratamiento. A pesar de una NRS del dolor inicial más alta para el grupo de solución salina en comparación con el grupo de Ampion™, hubo una tendencia hacia un efecto a largo plazo del fármaco de estudio, con un mayor porcentaje de sujetos que respondieron en el día 84 para Ampion™ en comparación con la solución salina. En los sujetos que recibieron Ampion™, el dolor general se redujo después de la dosis durante la duración del estudio, mientras que los sujetos que recibieron solución salina no tuvieron una reducción del dolor después de la dosis en el día 84. El uso de medicación de rescate de paracetamol hasta 72 horas después de la dosis fue mayor en el grupo de Tratamiento E (solución salina). El Ampion™ se consideró seguro y bien tolerado a la dosis utilizada en el estudio.

#### 45 **Ejemplo 3**

Este estudio demuestra que DA-DKP y N-Acetil Triptófano (NAT) de la fracción < 5 kDa de HAS al 5 % se unen al colágeno. En particular, a una concentración equimolar, NAT se une más al colágeno IV oxidado que DA-DKP.

#### 50 Métodos

Fuente de colágeno: 1 mg/ml de colágeno IV en forma de placenta humana en ácido acético al 0,25 % (Sigma™). El colágeno se oxidó con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 500 mM en PBS 1X durante 1 hora a 37 °C. El colágeno IV oxidado (final = 0,2 mg/ml) se incubó luego con DA-DKP 2 mM o NAT 2 mM en PBS durante 1 hora a 37 °C. Al final de la incubación, la fracción < 5 kDa se aisló mediante un filtro microcentrifugal Vivaspin 2 que tenía un límite de peso molecular de 5.000. La fracción de < 5 kDa se analizó para determinar el contenido de DA-DKP y/o NAT utilizando un método de cromatografía líquida-espectrometría de masas (LCMS, de sus siglas en inglés) para el análisis de DA-DKP.

60 Los resultados de los análisis se muestran en la Tabla 10.

**Tabla 10 Posible unión de NAT y DA-DKP a colágeno humano tratado con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>**

<b>Muestra</b>	<b>% de disminución promedio</b>	<b>Desviación estándar</b>
DA-DKP 2 mM + colágeno IV	26,0 %	4,2 %
DA-DKP 2 mM + colágeno IV con 2 NAT	25,6 %	5,7 %
NAT 2 mM + colágeno IV	48,9 %	1,3 %
NAT 2 mM + colágeno IV con DA-DKP 2 mM	28,7 %	9,4 %

Los resultados proporcionados en la Tabla 10 demuestran que DA-DKP y NAT se unen a formas oxidadas de colágeno y, por lo tanto, bloquean los sitios oxidados que desencadenan la activación de las células inmunitarias.



## REIVINDICACIONES

1. Una composición farmacéutica que comprende DA-DKP, para usar en un método de tratamiento de una artropatía degenerativa en un animal.
2. La composición para su uso de acuerdo con la reivindicación 1, en donde la artropatía degenerativa es artrosis.
3. La composición para su uso de acuerdo con la reivindicación 1, en donde la composición se administra no más frecuentemente que una vez cada seis meses, una vez cada 5 meses, una vez cada 4 meses, una vez cada 3 meses o una vez cada 2 meses.
4. La composición para su uso de acuerdo con la reivindicación 1, en donde la composición se administra por una vía de administración seleccionada del grupo que consiste en administración local, administración tópica e inyección.
5. La composición para su uso de acuerdo con la reivindicación 4, en donde la administración mediante inyección es mediante inyección intrarticular.
6. La composición para su uso de acuerdo con la reivindicación 5, en donde la composición administrada mediante inyección intrarticular es una composición que tiene una concentración de DA-DKP de aproximadamente 50 mM a aproximadamente 350 mM.
7. La composición para su uso de acuerdo con la reivindicación 1, en donde la DA-DKP está en una composición preparada mediante la eliminación de albúmina de una solución de una composición de seroalbúmina humana.
8. La composición para su uso de acuerdo con la reivindicación 7, en donde la etapa de eliminar la albúmina comprende tratar la composición de seroalbúmina humana mediante un método de separación seleccionado del grupo que consiste en ultrafiltración, centrifugación en gradiente de sacarosa, cromatografía, precipitación salina y sonicación.
9. La composición para su uso de acuerdo con la reivindicación 8, en donde la etapa de eliminación comprende el paso de la composición de seroalbúmina humana sobre una membrana de ultrafiltración con un límite de peso molecular que retiene la albúmina, y en donde el filtrado resultante comprende DA-DKP.
10. La composición para su uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, en donde la composición comprende además N-acetiltriptófano (NAT), ácido caprílico, caprilato o combinaciones de los mismos.
11. La composición para su uso de acuerdo con la reivindicación 10, en donde la composición es una composición que tiene una concentración de NAT, ácido caprílico, caprilato o combinaciones de los mismos de aproximadamente 4 mM a aproximadamente 20 mM.
12. La composición para su uso de acuerdo con cualquier reivindicación precedente, en donde la composición farmacéutica comprende además un segundo fármaco seleccionado del grupo que consiste en un analgésico, un fármaco antiinflamatorio y combinaciones de los mismos.
13. La composición farmacéutica para su uso de acuerdo con la reivindicación 1, en donde la composición se administra mediante inyección intrarticular, en donde la composición se prepara mediante la eliminación de albúmina de una solución de una composición de seroalbúmina humana.
14. La composición para su uso de acuerdo con la reivindicación 13, en donde la etapa de eliminación comprende el paso de la composición de seroalbúmina humana sobre una membrana de ultrafiltración con un límite de peso molecular que retiene la albúmina, y en donde el filtrado resultante comprende DA-DKP.
15. La composición para su uso de acuerdo con la reivindicación 13 o 14, en donde la composición comprende además N-acetiltriptófano (NAT), ácido caprílico, caprilato o combinaciones de los mismos.
16. La composición para su uso de acuerdo con la reivindicación 15, en donde la composición es una composición que tiene una concentración de NAT, ácido caprílico, caprilato o combinaciones de los mismos de aproximadamente 4 mM a aproximadamente 20 mM.

Figura 1

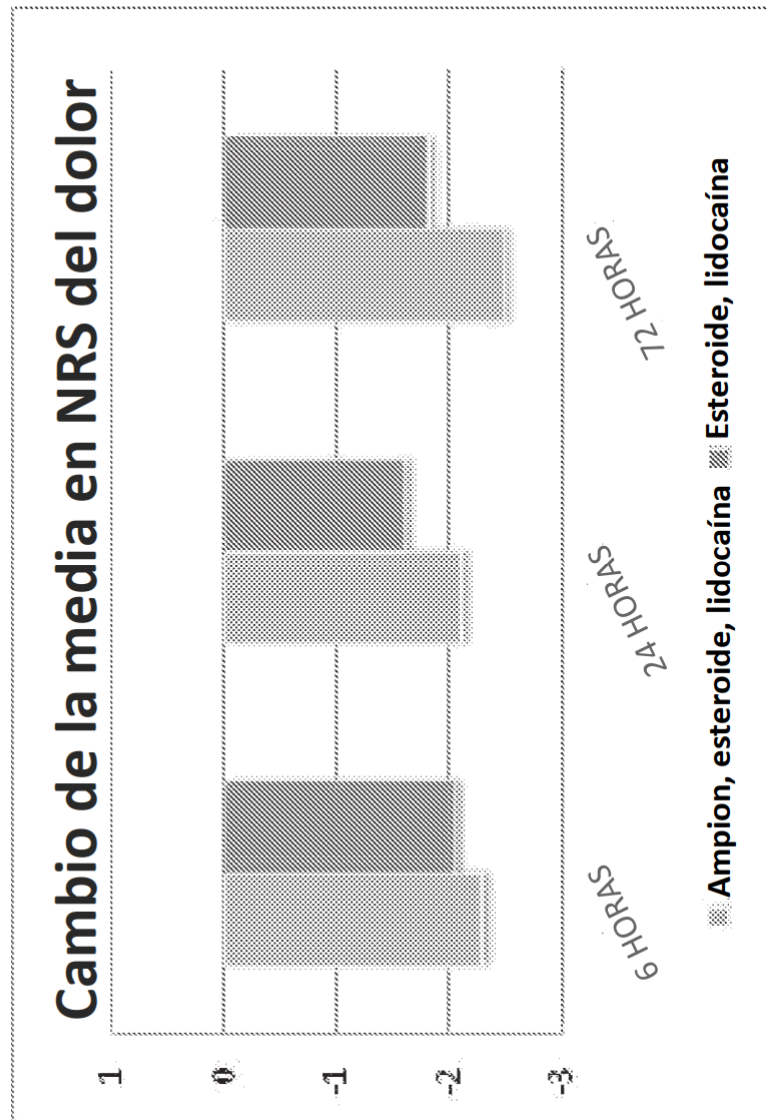


Figura 2  
Cambio de la media en NRS del dolor

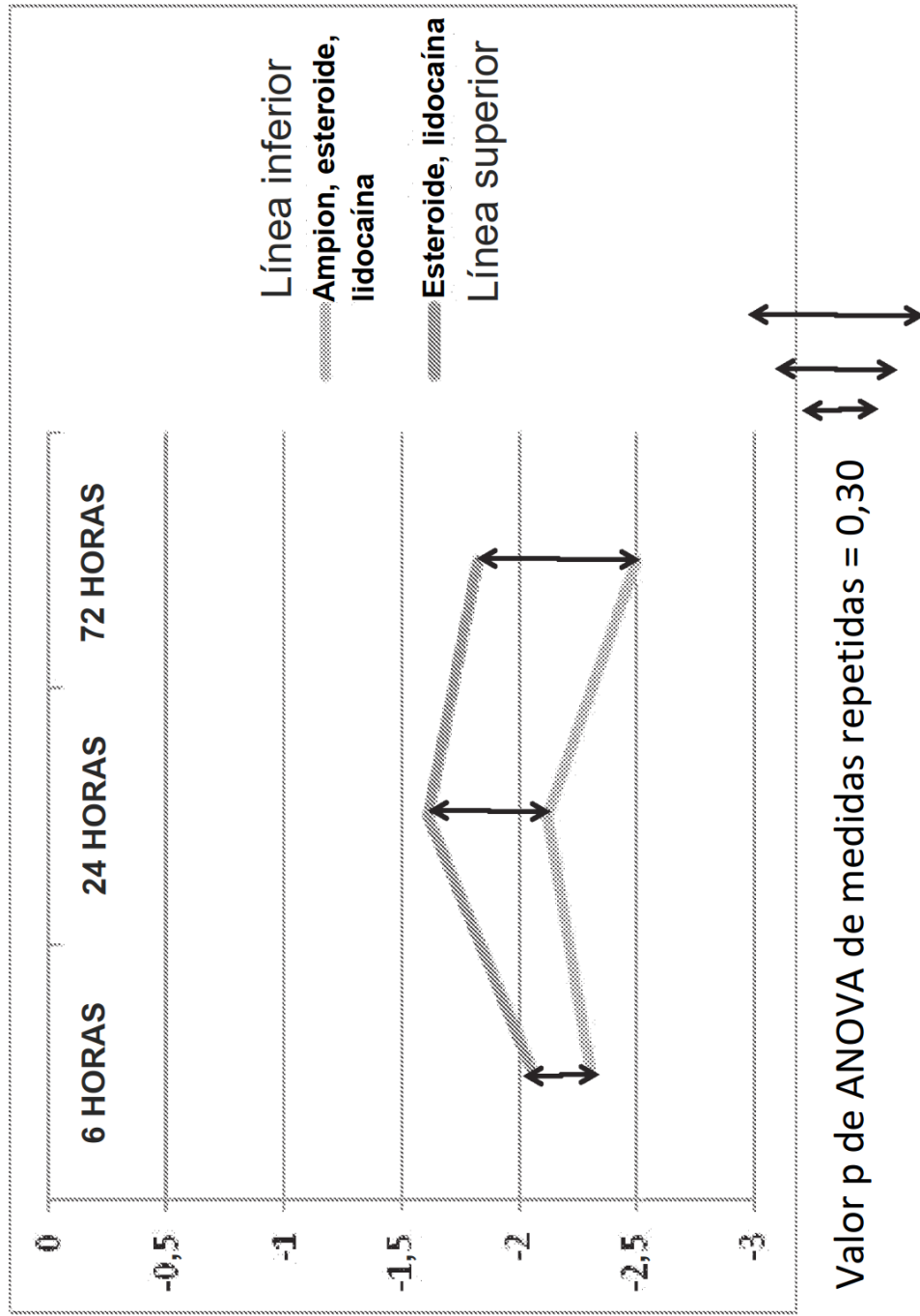


Figura 3A

DIFERENCIA ABSOLUTA EN WOMAC DE DOLOR A PARTIR DE VALORES INICIALES

24 HORAS-VALORES INICIALES

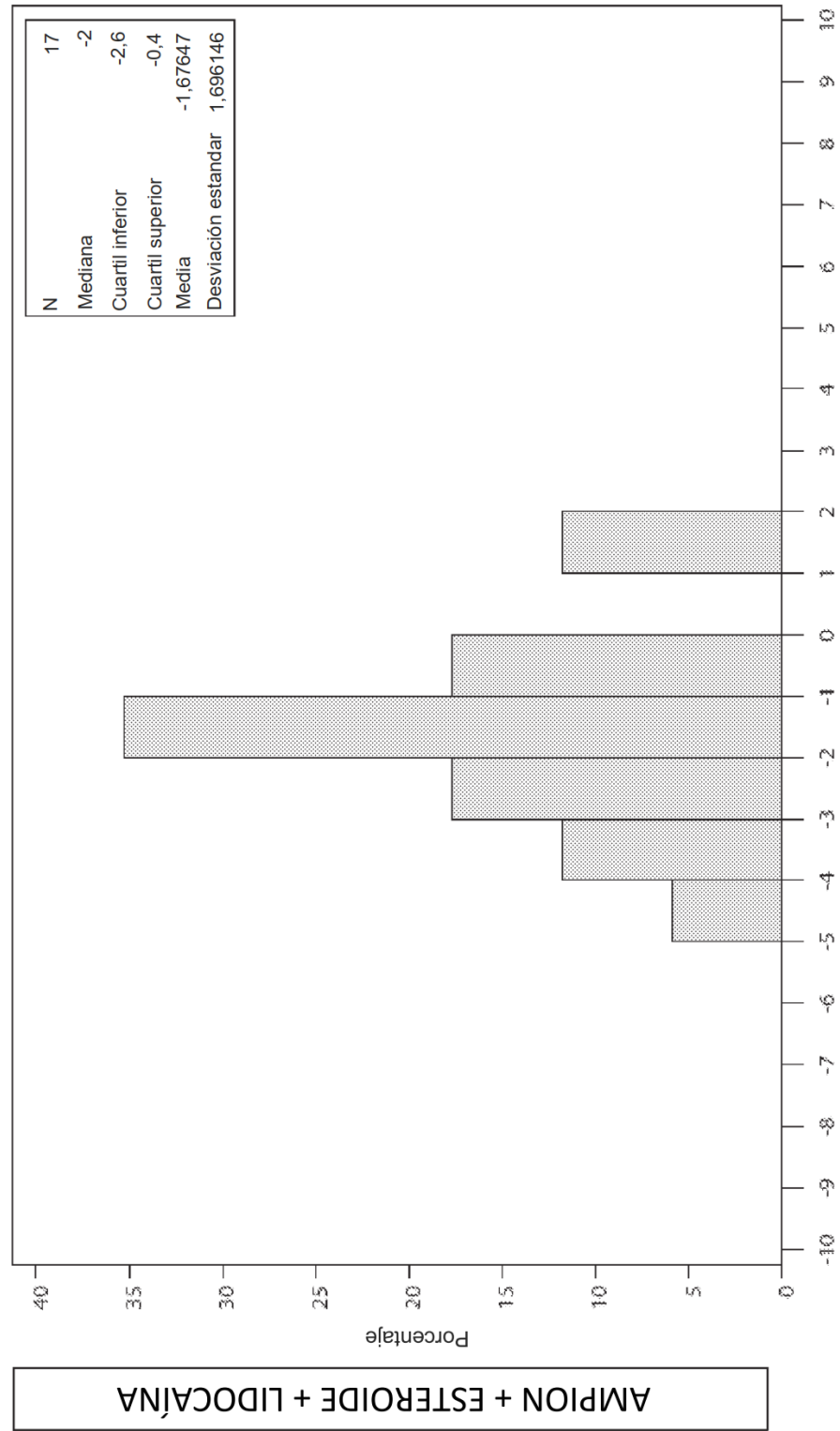


Figura 3A Cont.

DIFERENCIA ABSOLUTA EN WOMAC DE DOLOR A PARTIR DE VALORES INICIALES  
24 HORAS-VALORES INICIALES

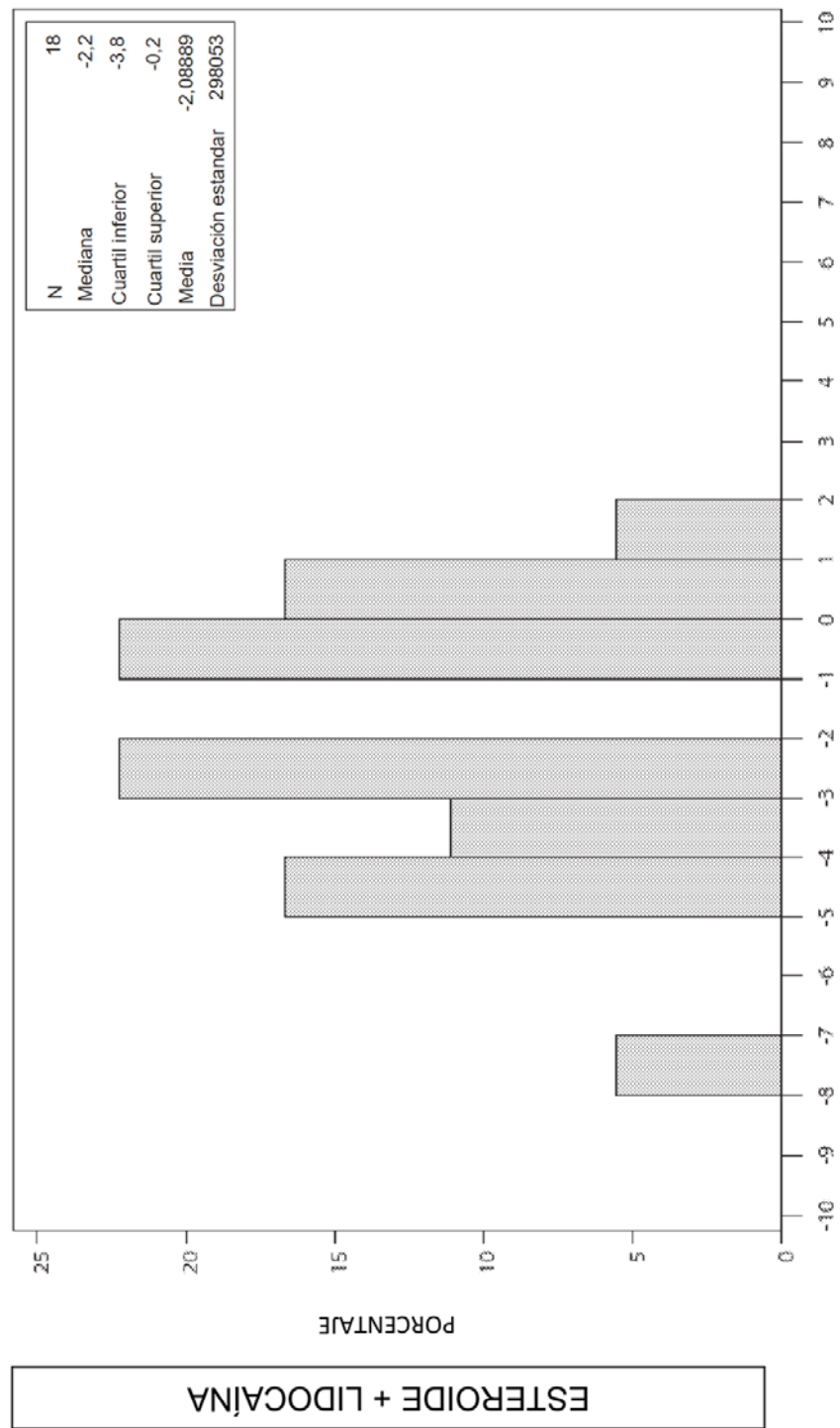


Figura 3B

DIFERENCIA ABSOLUTA EN WOMAC DE DOLOR A PARTIR DE VALORES INICALES  
72 HORAS-VALORES INICALES

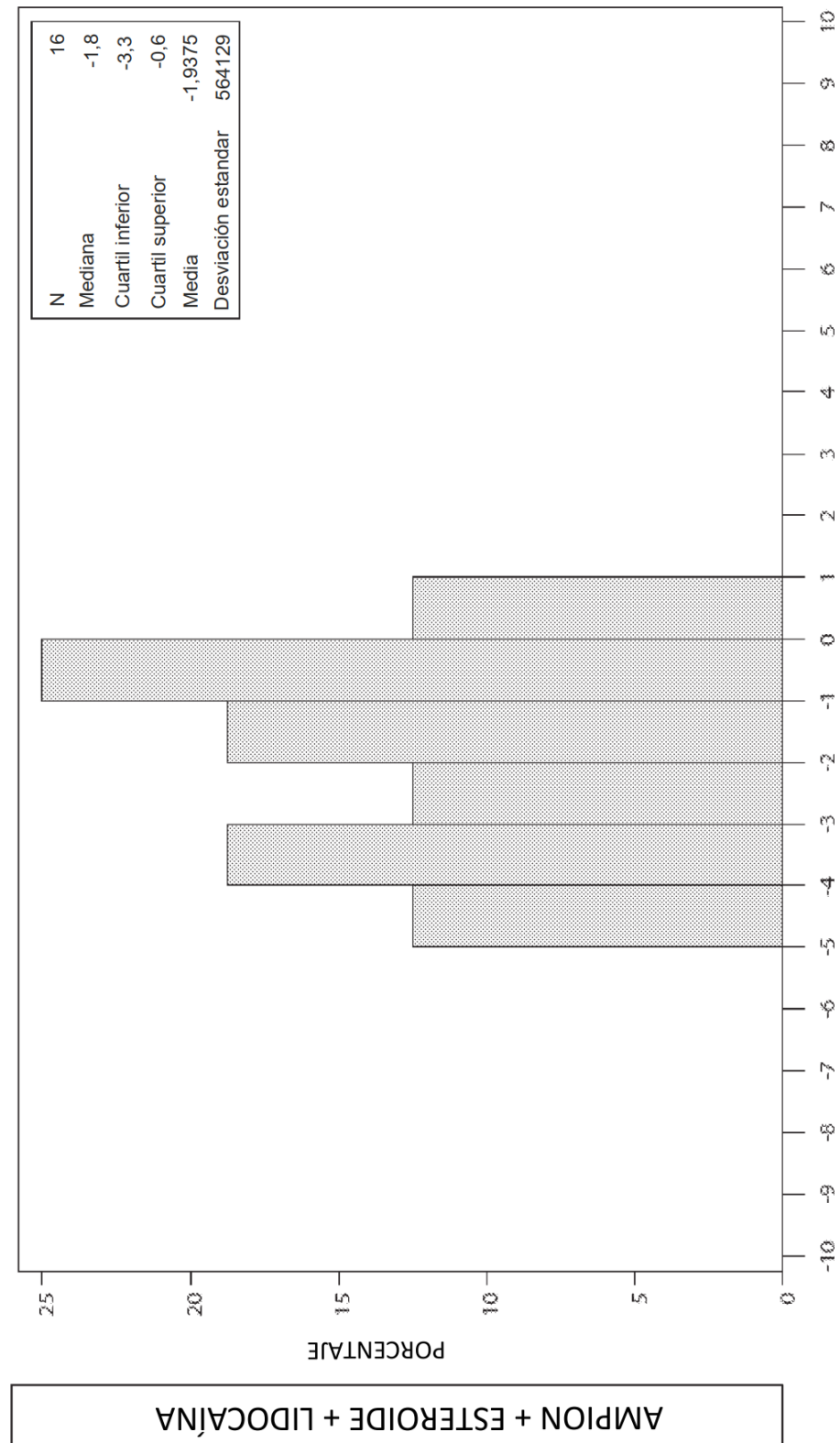


Figura 3B Cont.  
DIFERENCIA ABSOLUTA EN WOMAC DE DOLOR A PARTIR DE VALORES INICIALES  
72 HORAS-VALORES INICIALES

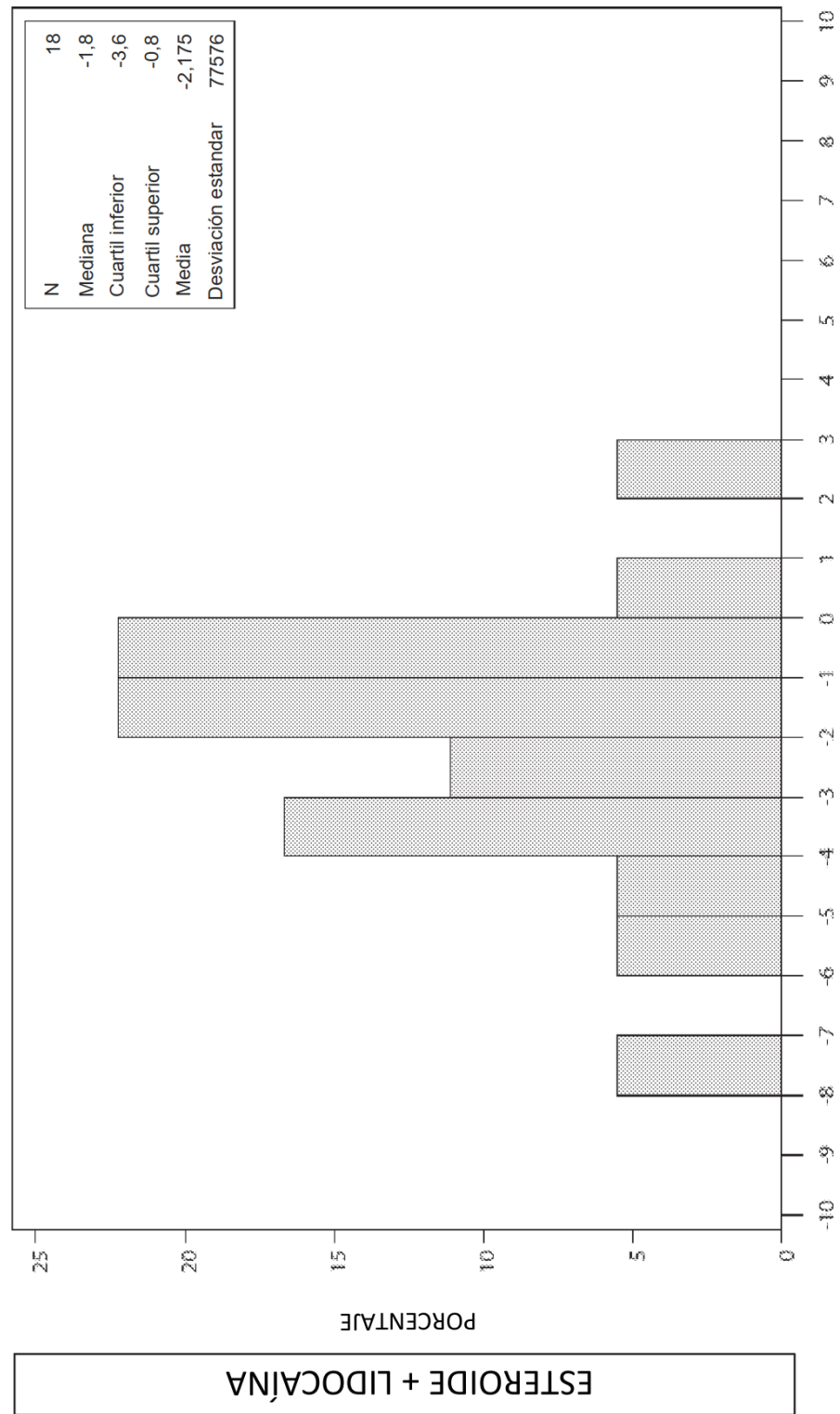




Figura 4A

DIFERENCIA ABSOLUTA EN WOMAC DE RIGIDEZ A PARTIR DE VALORES INICIALES

24 HORAS-VALORES INICIALES

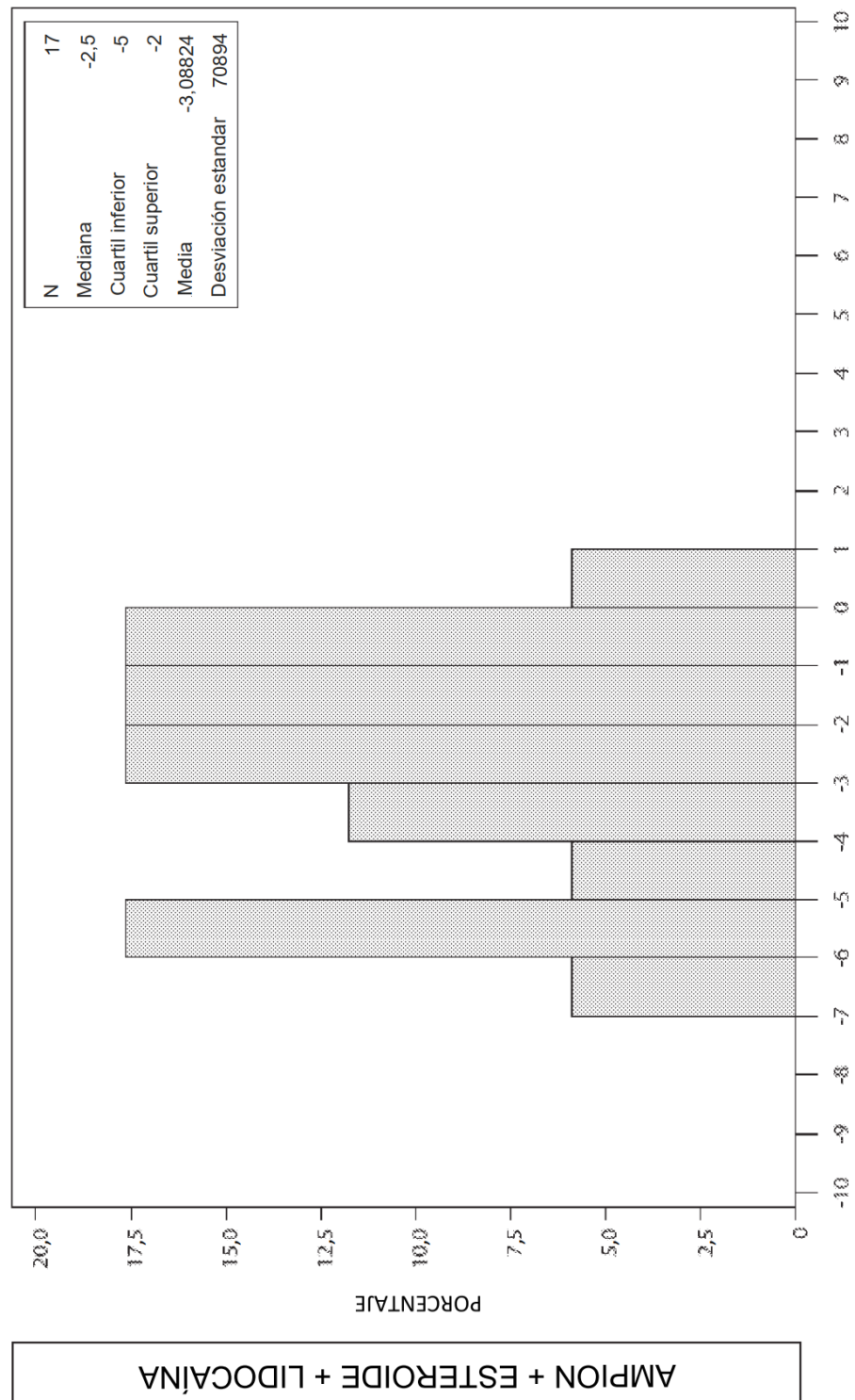




Figura 4A Cont.

DIFERENCIA ABSOLUTA EN WOMAC DE RIGIDEZ A PARTIR DE VALORES INICIALES  
24 HORAS-VALORES INICIALES

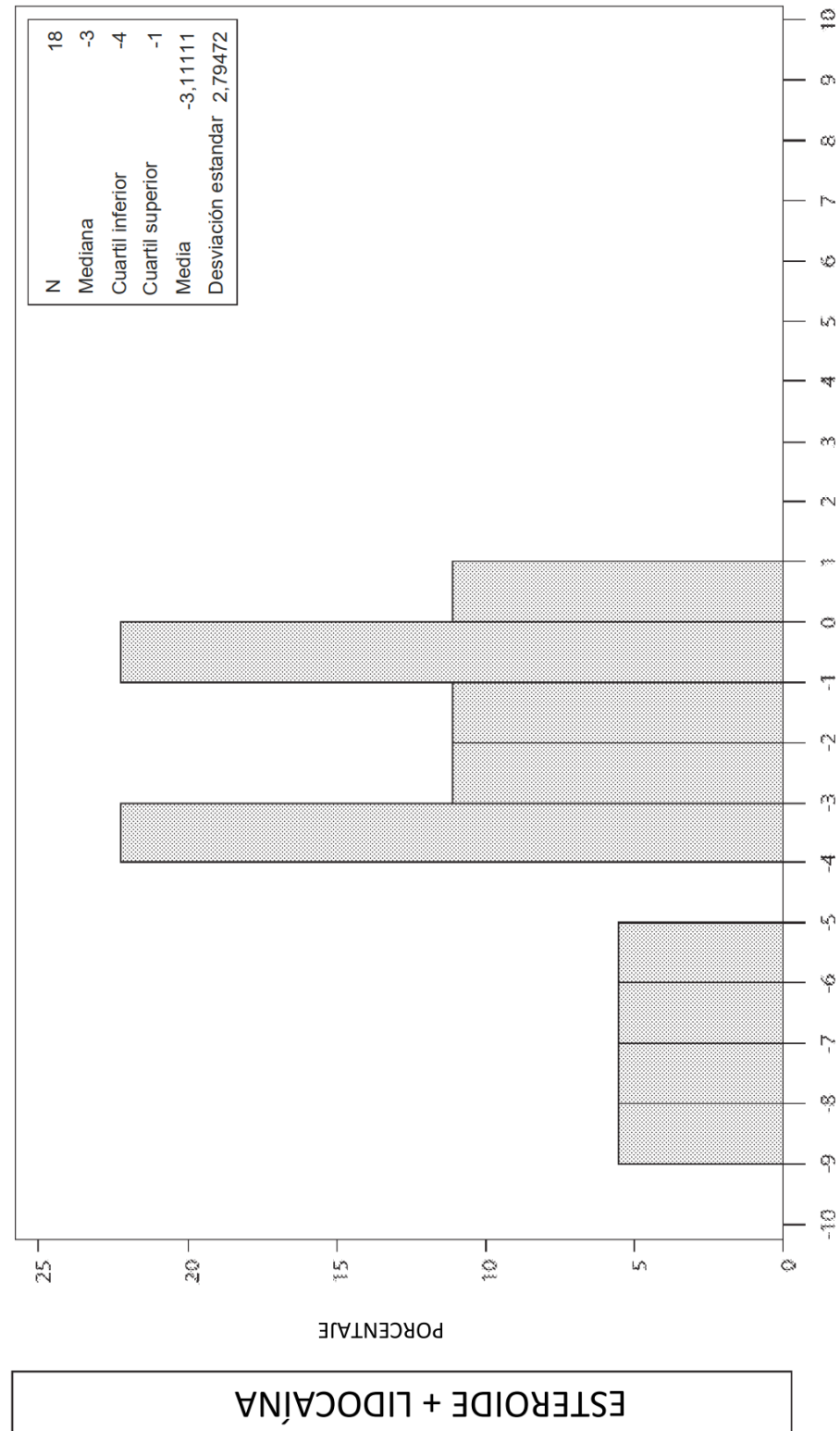


Figura 4B

DIFERENCIA ABSOLUTA EN WOMAC DE RIGIDEZ A PARTIR DE VALORES INICALES

72 HORAS-VALORES INICALES

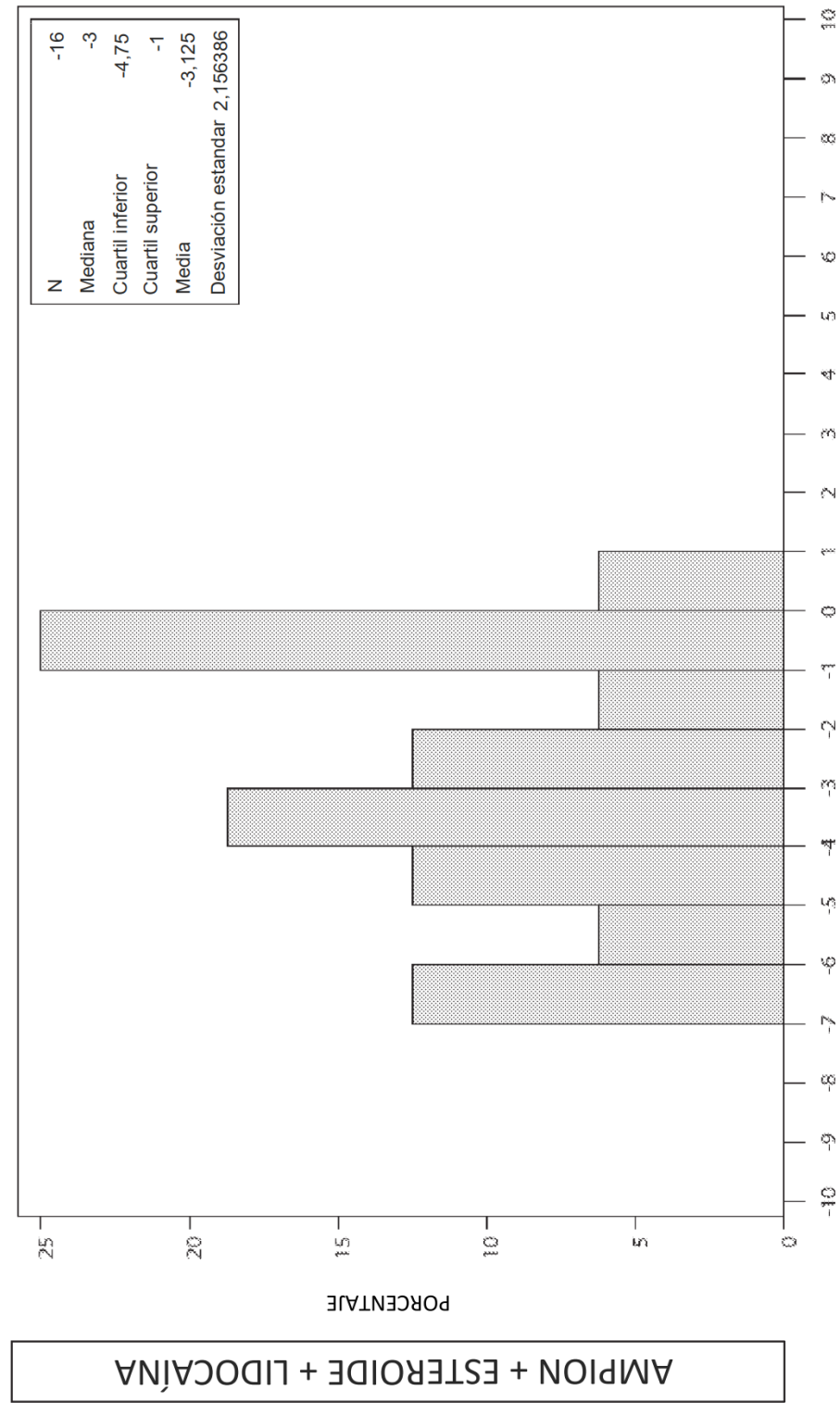


Figura 4B Cont.

DIFERENCIA ABSOLUTA EN WOMAC DE RIGIDEZ A PARTIR DE VALORES INICIALES

72 HORAS-VALORES INICIALES

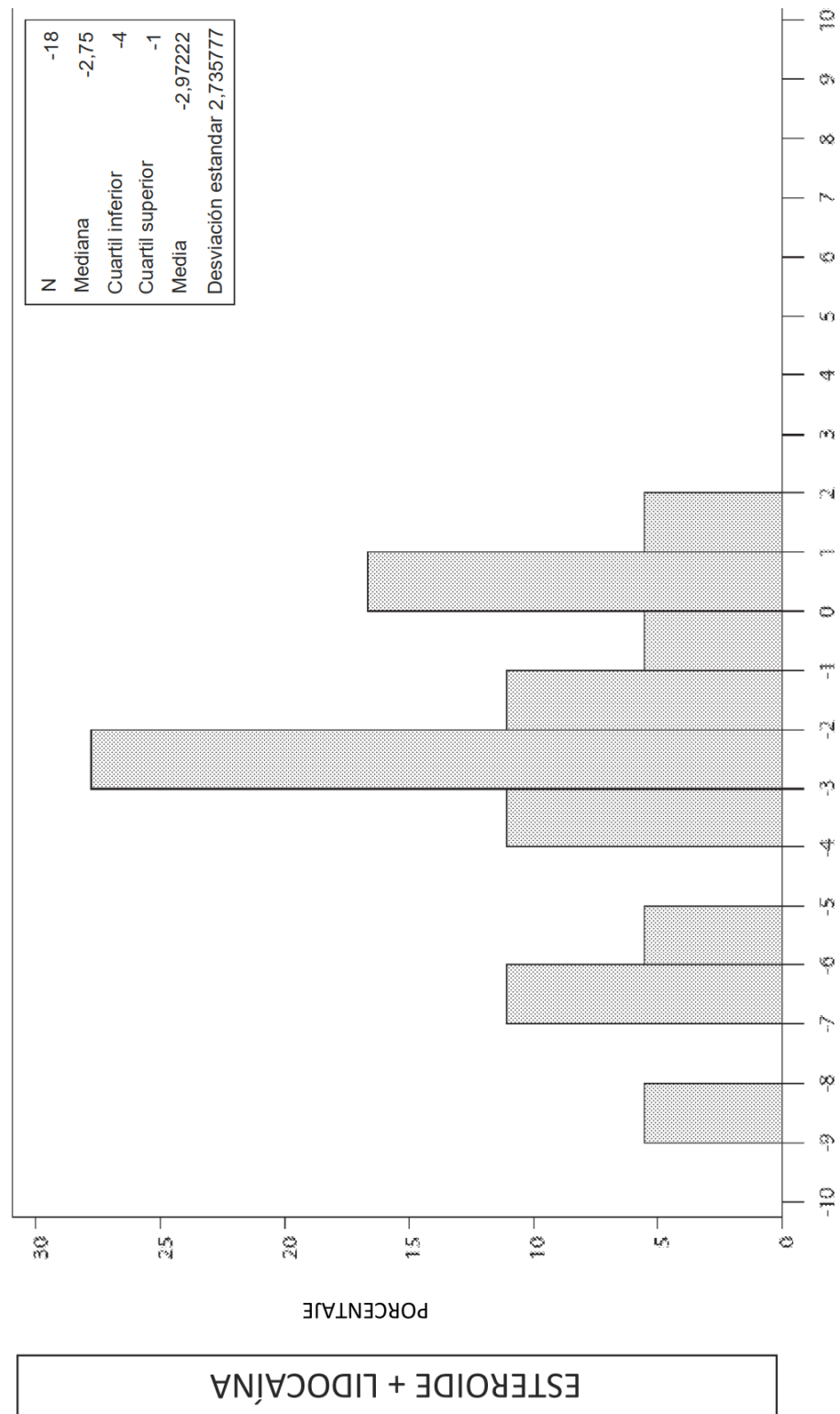


Figura 5A

DIFERENCIA ABSOLUTA EN WOMAC DE FUNCIÓN A PARTIR DE VALORES INICIALES  
24 HORAS-VALORES INICIALES

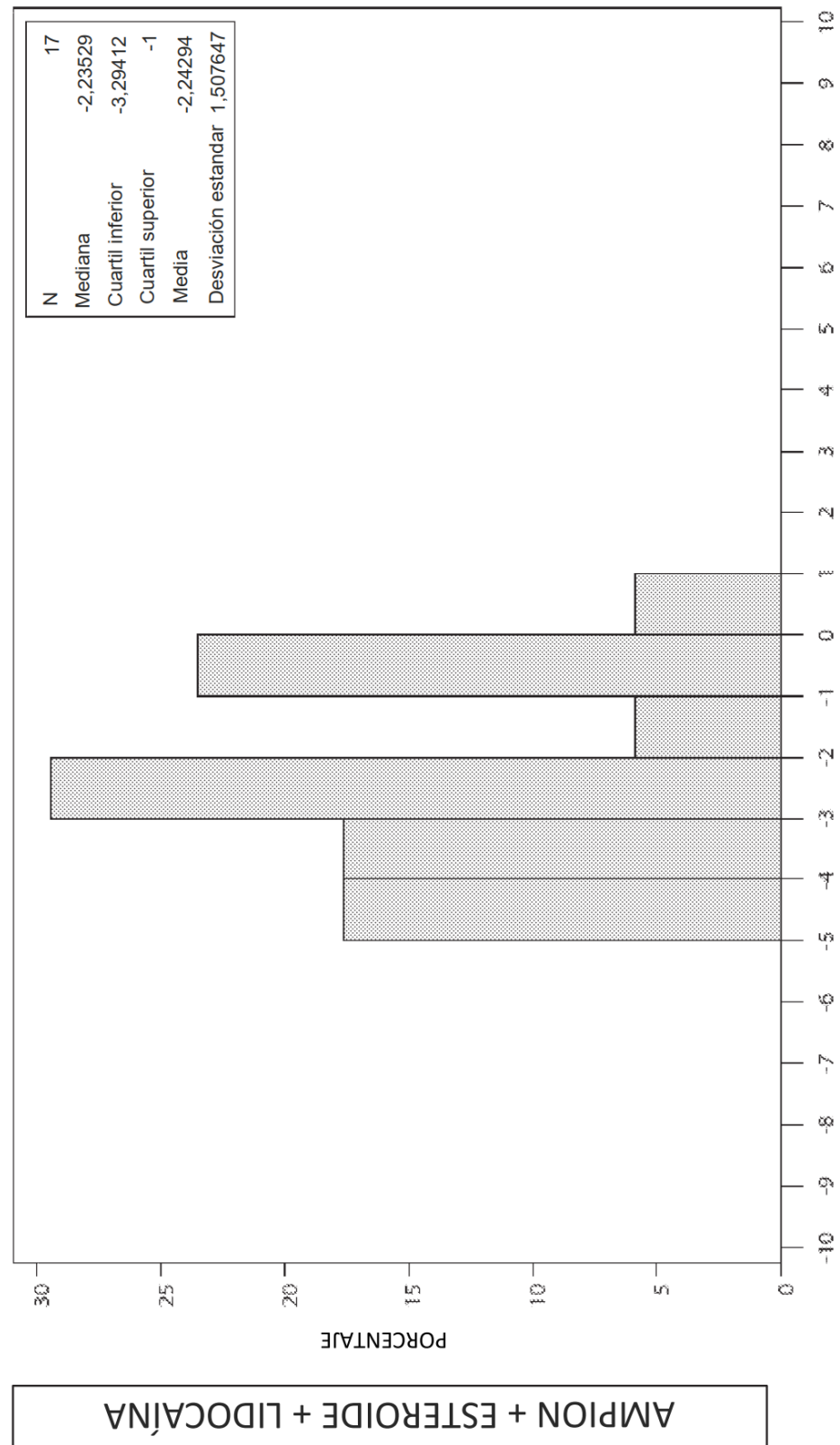


Figura 5A Cont.

DIFERENCIA ABSOLUTA EN WOMAC DE FUNCIÓN A PARTIR DE VALORES INICIALES

24 HORAS-VALORES INICIALES

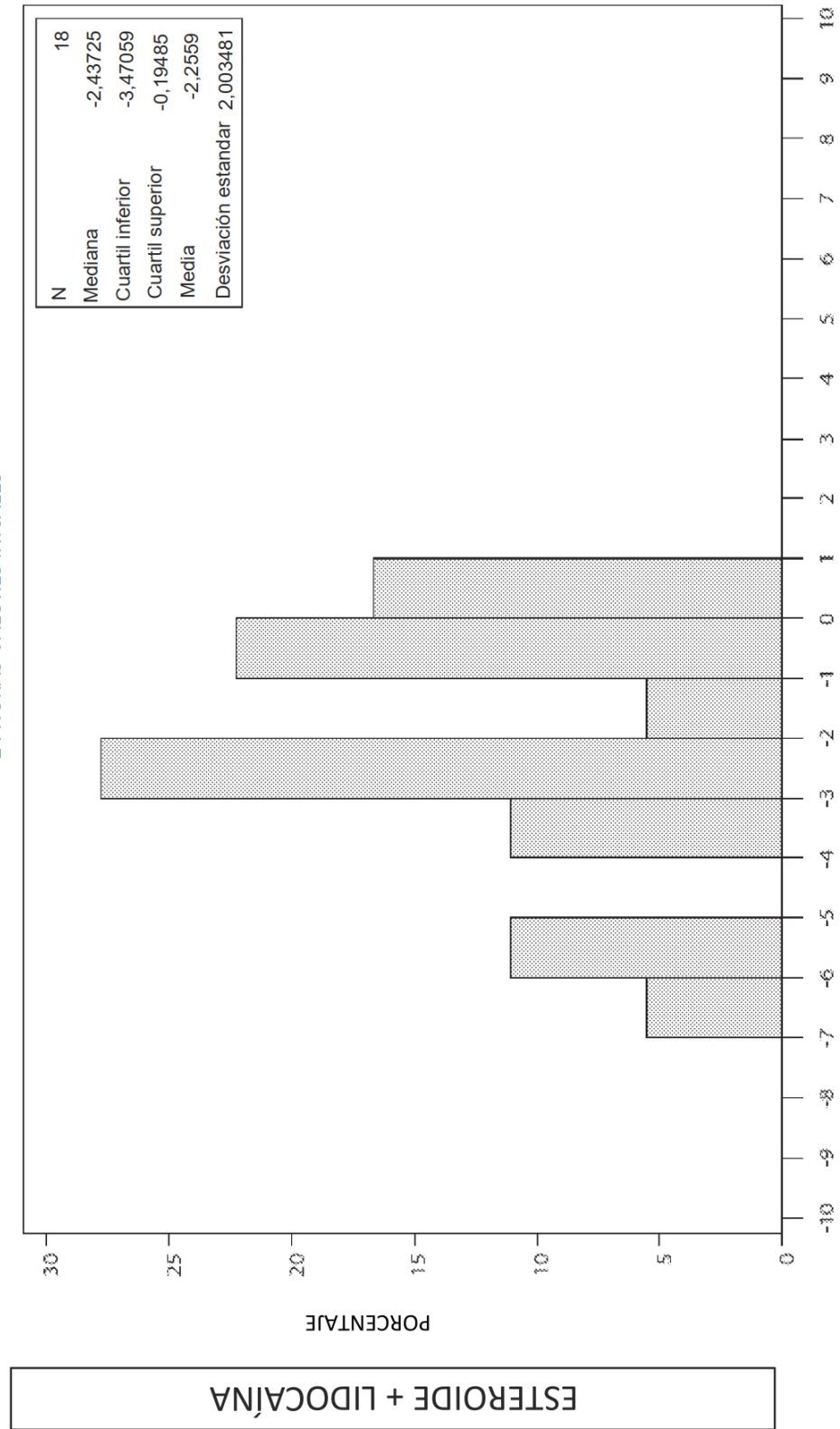


Figura 5B

DIFERENCIA ABSOLUTA EN WOMAC DE FUNCIÓN A PARTIR DE VALORES INICALES

72 HORAS-VALORES INICALES

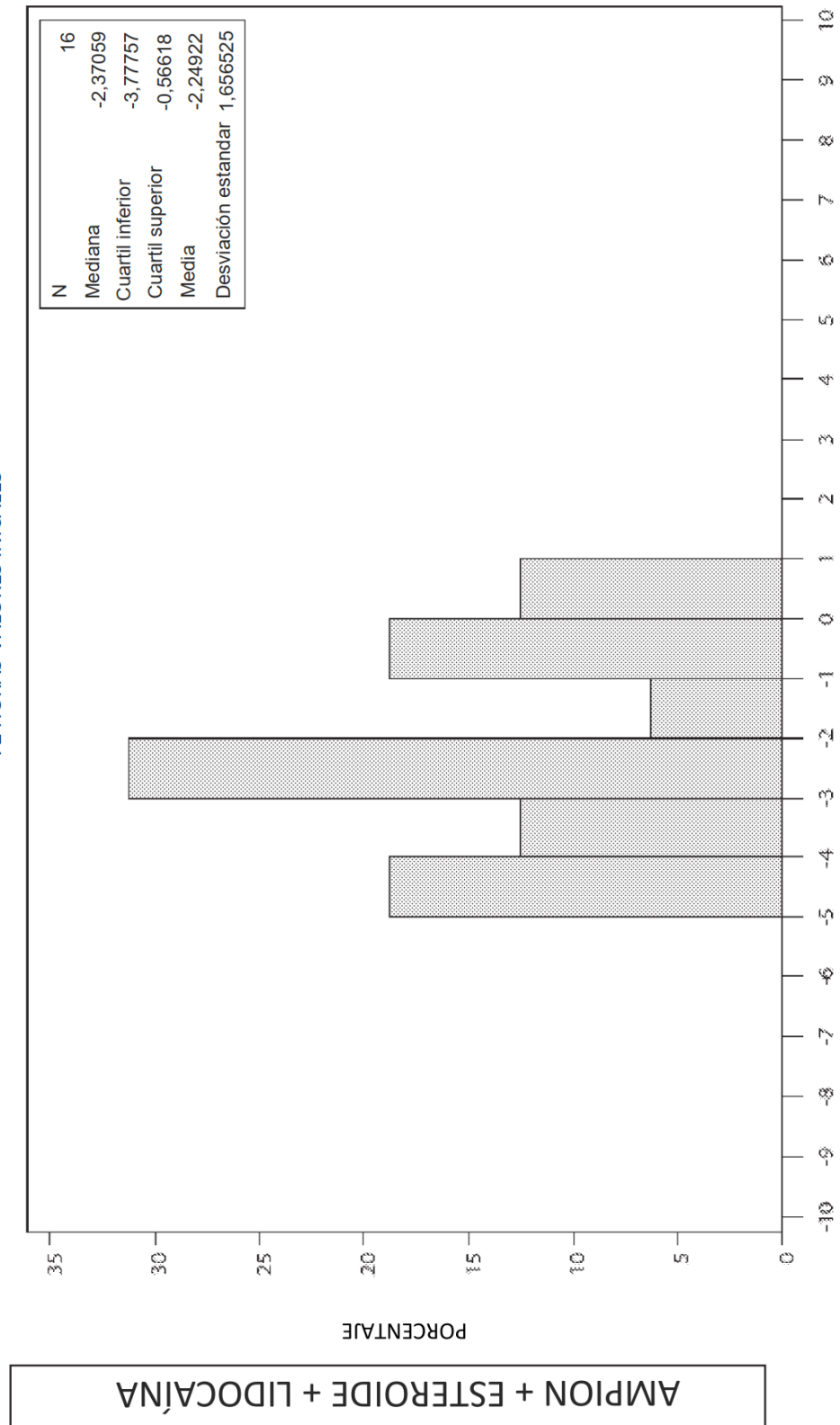




Figura 5B Cont.

DIFERENCIA ABSOLUTA EN WOMAC DE FUNCIÓN A PARTIR DE VALORES INICIALES

72 HORAS-VALORES INICIALES

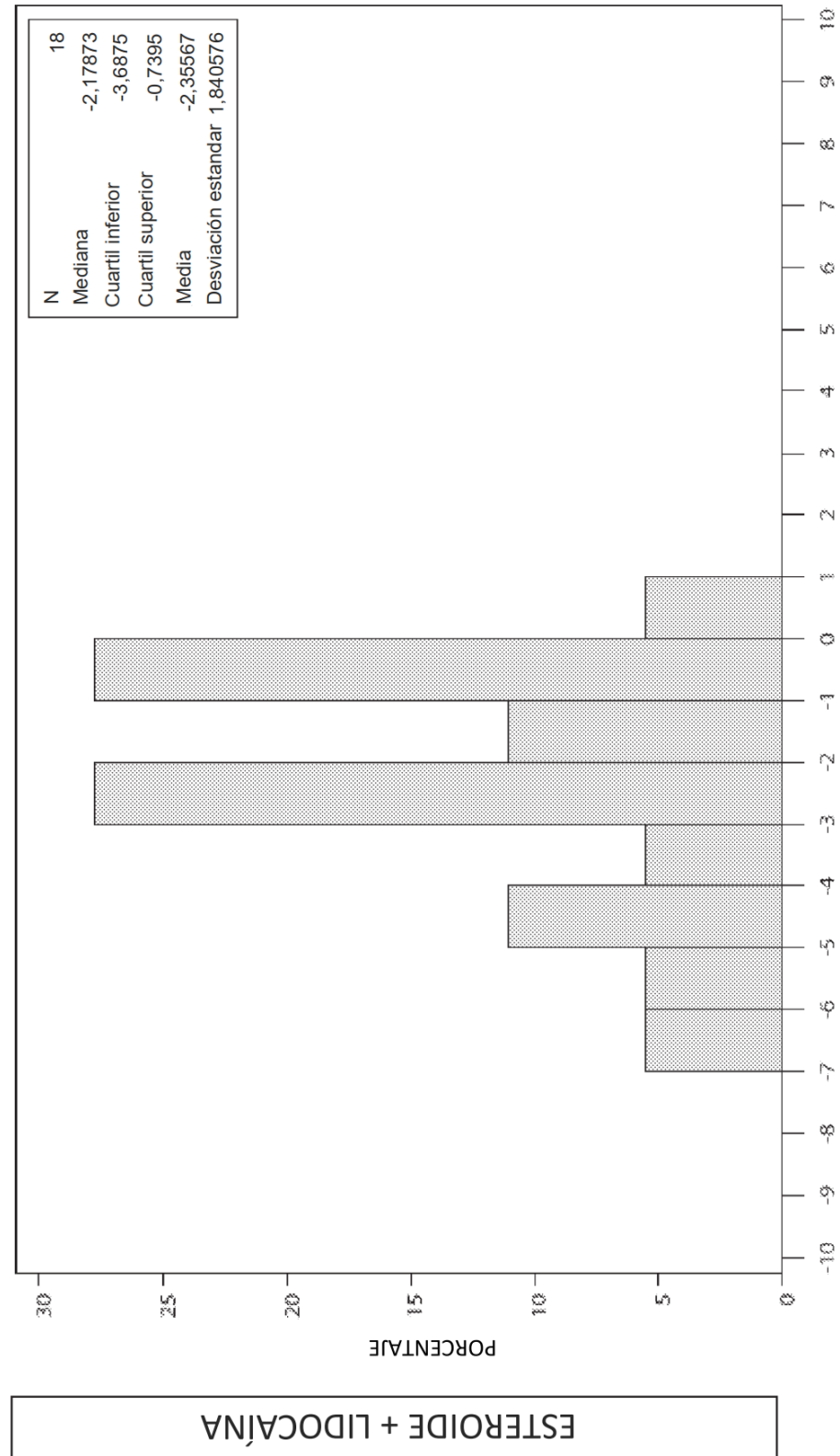


Figura 6

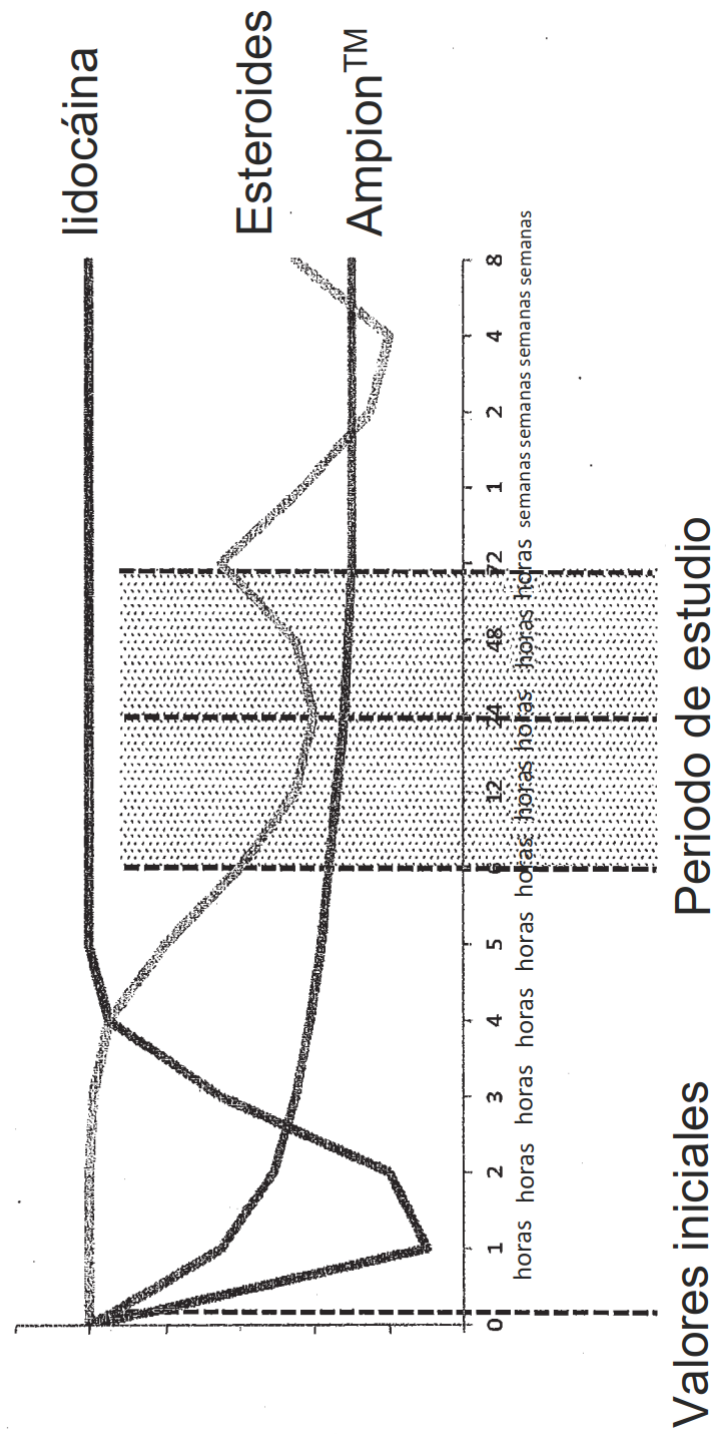




Figura 7

