



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 361 024**

51 Int. Cl.:

A61K 31/715 (2006.01)

A61K 31/737 (2006.01)

A61K 36/02 (2006.01)

A61K 36/04 (2006.01)

A61P 19/02 (2006.01)

A61P 19/06 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **06821630 .8**

96 Fecha de presentación : **07.12.2006**

97 Número de publicación de la solicitud: **1957088**

97 Fecha de publicación de la solicitud: **20.08.2008**

54 Título: **Viscosuplementación con polisacáridos algáceos en el tratamiento de la artritis.**

30 Prioridad: **08.12.2005 IL 172477**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
13.06.2011

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
13.06.2011

73 Titular/es: **Ben Gurion University of the Negev
Research and Development Authority
P.O.B. 653
84105 Beer Sheva, IL**

72 Inventor/es: **Arad, Shosh y
Atar, Dan**

74 Agente: **Lehmann Novo, María Isabel**

ES 2 361 024 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

Viscosuplementación con polisacáridos algáceos en el tratamiento de la artritis.

Campo de la invención

La presente invención se refiere a composiciones que comprenden polisacáridos de algas rojas del género *Porphyridium* de uso en un viscosuplemento para tratar articulaciones afectadas por la artritis o por enfermedades relacionadas con la lubricación de las articulaciones.

Antecedentes de la invención

La artritis es una inflamación crónica de una articulación, que va acompañada de dolor, hinchazón y limitación del movimiento en las articulaciones y el tejido conjuntivo. Más de 40 millones de personas en Estados Unidos padecen artritis. Las formas más prevalentes de la artritis son la osteoartritis y la artritis reumatoide, ambas son enfermedades progresivas y degenerativas que producen varios grados de incapacidad. El cartílago y el hueso de la articulación se destruyen con el avance de la enfermedad, esto va seguido de la pérdida de movilidad y un mayor sufrimiento debido, entre otras cosas, al rozamiento de hueso con hueso.

Las terapias disponibles en la actualidad incluyen el tratamiento paliativo, basado en el uso de analgésicos o antiinflamatorios, y cirugía, que comprende la implantación de una prótesis parcial o total de las articulaciones. La implantación de una prótesis total se emplea habitualmente para la rodilla, que es la articulación más importante a la que la enfermedad suele afectar. Esta es una operación costosa que incluye molestias en el paciente, una posible morbilidad posoperatoria importante y riesgos asociados con la cirugía ya que esta requiere la apertura de la articulación. La implantación de una prótesis también presenta un inconveniente por su durabilidad limitada, ya que las prótesis implantadas duran aproximadamente 10-15 años. Un método alternativo es la viscosuplementación, que es una inyección en la articulación de un lubricante biocompatible que reduce la fricción y el dolor. El fundamento de este método tiene origen en la fisiología de las articulaciones, en las que la membrana sinovial produce un líquido lubricante altamente viscoso que consiste en sustancias de alto peso molecular, tales como hialuronano (ácido hialurónico) y lubricina. La naturaleza altamente viscosa del líquido sinovial es importante para el funcionamiento normal de las articulaciones, ya que proporciona una superficie de separación casi sin rozamiento para el movimiento de las articulaciones. Una molécula de polisacárido hialuronano ($3\text{-}5 \times 10^6$ daltons), conformada por los monosacáridos *N*-acetilglucosamina y ácido glucurónico, se une a muchas moléculas de agua en su estructura polianiónica, lo cual es importante para sus propiedades mecánicas. En los últimos años se han desarrollado varios productos de viscosuplementación, basados en preparados de hialuronano, con el fin de restablecer la composición del líquido sinovial afectado en pacientes con osteoartritis, de esta forma se proporciona alivio de los síntomas a estos pacientes. El hialuronano de estos viscosuplementos normalmente proviene de crestas de pollos (SynviscTM) o se produce de forma sintética (ArthreaseTM).

Se han llevado a cabo varios estudios para evaluar la eficacia del hialuronano exógeno en el tratamiento de la osteoartritis y se han obtenido resultados contradictorios. En un ensayo de 91 pacientes, la viscosuplementación de hialuronano no tuvo un efecto significativamente mejor que el del placebo en el tratamiento de la osteoartritis [Henderson K, *et al.*: Ann. Rheum. Dis. 53 (1994) 529-34]. En otro ensayo, un subgrupo de pacientes mayores de 60 años con síntomas más graves notificó efectos beneficiosos de la terapia de viscosuplementación [Wen D.Y.: Am. Fam. Physician 62 (2000) 565-70]. Un metaanálisis que recopilaba los descubrimientos de ocho estudios diferentes en un total de 971 pacientes indicó que el tratamiento con hialuronano superó a un placebo en el alivio de los síntomas relacionados con la osteoartritis [George E.: Ann. Rheum. Dis. 57 (1998) 637-40]. Las limitaciones de los efectos beneficiosos de la inyección de hialuronano pueden deberse a la limitada estabilidad del hialuronano en el líquido sinovial. Por ejemplo, se descubrió que la semivida del hialuronato en articulaciones ovinas era inferior a 24 horas [Fraser J.R.E., *et al.*: Semin. Arthritis Rheum. 22(6S) (1993) 9-17]. El ácido hialurónico probablemente es hidrolizado por las enzimas hialuronidasa, presentes en tejidos de mamíferos. Otro inconveniente de los viscosuplementos procedentes de crestas de pollos es que se induzca una posible reacción alérgica en individuos alérgicos a proteínas, plumas y huevos de aves.

La disponibilidad de una terapia de viscosuplementación eficaz proporcionaría alivio a pacientes que padecen trastornos relacionados con la enfermedad articular degenerativa y con la lubricación de las articulaciones, y en casos más graves, pospondría la necesidad de llevar a cabo una intervención quirúrgica y reduciría el número de operaciones realizadas. Por lo tanto, un objeto de esta invención es proporcionar una composición que actúe como viscosuplemento que presente una alta estabilidad en el líquido sinovial.

El documento CA 2249103 describe el ácido clamihialurónico, un ácido hialurónico nuevo procedente de algas verdes. El documento US 2005/0196410 describe un extracto de algas para retrasar la inflamación. El documento WO 01/82936 describe el uso de fucoídina, un polisacárido de algas marrones, para paliar la artritis. Huheihel *et al.* [J. Biochem. Biophys. Methods 50 (2002) 189-200] demuestra la actividad antivírica del polisacárido de la microalga roja *Porphyridium sp.* Se descubrió que los polisacáridos de diferentes especies de microalgas rojas son muy estables en solución, incluso cuando se exponen a un rango amplio de valores de pH y temperaturas [Geresh S., *et al.*: Biores. Technol. 38 (1991) 195-201]. No se comercializan enzimas, carbohidrolasas, capaces de escindir los polisacáridos de

microalgas rojas. Los monosacáridos principales son xilosa, glucosa y galactosa [Geresh S., *et al.*: Carbohydr. Res. 208 (1990) 301-5] sulfatados en la posición 3 ó 6 de los monosacáridos glucosa y galactosa [Lupescu N., *et al.*: Carbohydr. Res. 210 (1991) 349-52]. Se ha estimado que la masa molecular de los polisacáridos de microalgas rojas es superior a 3-5 millones de daltons. Es un objeto de esta invención proporcionar una composición que actúe como viscosuplemento con una alta estabilidad en el líquido sinovial que contenga polisacáridos de algas rojas. También es un objeto de esta invención proporcionar una composición que actúe como viscosuplemento que presente resistencia *in vitro* a la hialuronidasa. Otros objetos y ventajas de la presente invención irán apareciendo durante el avance de la descripción.

Resumen de la invención

Esta invención proporciona una composición que contiene un polisacárido de la microalga roja del género *Porphyridium* para uso como un viscosuplemento, donde dicho polisacárido algáceo está preferentemente en una solución acuosa en una concentración de un 0.5 a un 2%p/p. La composición de la invención tiene una viscosidad en el rango de 500 a 8000 cP a temperatura ambiente y es resistente a la hialuronidasa (*in vitro*). Los polisacáridos se preparan partiendo de algas del género *Porphyridium*. La composición de acuerdo con la invención puede comprender además un analgésico, antiinflamatorio, antimicrobiano, antivírico, anestésico, relajante muscular, sales, tampones, diluyentes o un medicamento necesario para tratar un trastorno concurrente, tal como un antibiótico, corticoide, antialérgico o antineoplásico.

Esta invención proporciona además el uso de un polisacárido de algas del género *Porphyridium* en el tratamiento de la artritis y otros trastornos relacionados con la lubricación de las articulaciones, preferentemente osteoartritis, artritis reumatoide, gota, traumatismo, degeneración (relacionada con la edad), comprendiendo dicho tratamiento inyectar dicha composición en una articulación, que se selecciona entre rodilla, cadera, hombro, tobillo, codo, articulación facetaria espinal o nudillos. También se proporciona el uso de un polisacárido de algas del género *Porphyridium* en la preparación de una composición que actúe como viscosuplemento para tratar la artritis u otros trastornos relacionados con la lubricación de las articulaciones.

Esta invención también se refiere a un kit que comprende equipo estéril para inyectar los líquidos en una articulación, una composición que actúa como viscosuplemento que comprende un polisacárido de algas del género *Porphyridium* y las instrucciones del proveedor.

Descripción detallada de la invención

Se ha descubierto recientemente que las composiciones que contienen polisacáridos de microalgas rojas que pertenecen al género *Porphyridium* son estables en el líquido sinovial de mamíferos y exhiben propiedades superiores como viscosuplementos en las articulaciones. Los resultados preliminares han demostrado que las rodillas de conejos tratadas con el polisacárido mostraron menos cambios degenerativos en el cartílago en comparación con rodillas de conejos tratadas con los productos comerciales disponibles. Se separó una solución de polisacárido algáceo de un cultivo de *Porphyridium sp.* eliminando las células por centrifugación, y posteriormente se trató para eliminar las sales. En concentraciones de un 0.5% a un 2% p/p, la solución acuosa del producto tenía normalmente una viscosidad de entre 500 y 8000 cP. Se prepararon composiciones líquidas concentrando el polisacárido algáceo de cultivos hasta una concentración de un 0.5-2% en solución salina. El polisacárido se analizó para determinar su toxicidad y resultó ser seguro para uso en animales (Harlan Biotech Israel). Para comparar los efectos de una composición de esta invención y una composición de la técnica anterior, se inyectó una composición que contenía polisacárido algáceo o hialuronano en las rodillas de 6 conejos, en los que se había inducido la osteoartritis experimental (12 articulaciones en total), así pues 6 articulaciones para cada composición, y los efectos se examinaron en las articulaciones diseccionadas tras sacrificar los animales 12 semanas después del procedimiento. Los cambios degenerativos eran menos marcados en todos los animales que habían recibido el polisacárido algáceo.

La validación de los resultados obtenidos en el estudio piloto se inició con un estudio de seguimiento en ovejas. Resumiendo, se indujo la osteoartritis experimental mediante menisectomía lateral en ambas babillas de 24 ovejas hembra de la misma edad y el mismo rebaño. Después de la operación, se dejó que las ovejas deambularan libremente durante 16 semanas para que desarrollaran la osteoartritis. Después de 16 semanas, los animales se dividieron en tres grupos y cada grupo recibió un régimen de tratamiento que incluía la composición de polisacárido en una rodilla y un producto hialuronano comercializado, Arthrease, en la otra rodilla, el cual se empleó como grupo de control tal como se muestra en la Tabla 1.

Tabla 1. Protocolo del estudio

Número del grupo	Rodilla derecha	Rodilla izquierda
1 (8 animales)	Una sola inyección de polisacárido	Solución salina
2 (7 animales)	Una sola inyección de polisacárido	Una sola inyección de Arthrase una vez por semana durante tres semanas
3 (7 animales)	Una sola inyección de polisacárido una vez por semana durante 3 semanas	Una sola inyección de Arthrase una vez por semana durante tres semanas

Después de 12 semanas más, se sacrificaron las ovejas y se diseccionaron las rodillas. Las rodillas se sometieron a un examen histopatológico y se determinó la eficacia del polisacárido.

- 5 El polisacárido algáceo de *Porphyridium* en solución fisiológica y esterilizado en un autoclave, no fue degradado por la hialuronidasa *in vitro*, según indicaron las medidas de viscosidad.

Así pues, sin ceñirse a ninguna teoría, se sugiere, y es una parte de esta invención, que el hialuronano como polisacárido lubricante natural o como viscosuplemento, puede ser reemplazado por otro polisacárido siempre que este polisacárido sustituto sea polianiónico, de peso molecular elevado, atóxico y resistente a la hialuronidasa. Los aniones en dichos polisacáridos polianiónicos pueden ser proporcionados por el ácido glucurónico o por grupos éster sulfato. Los inventores descubrieron que los polisacáridos de microalgas rojas que pertenecen al género *Porphyridium* son viscosuplementos adecuados y el polisacárido de *Porphyridium* se presenta en la presente como la realización de esta invención.

15 Esta invención proporciona una composición que contiene un polisacárido de algas del género *Porphyridium* para su uso como viscosuplemento. Una composición de esta invención es preferentemente una solución acuosa que contiene dicho polisacárido algáceo en una concentración de un 0.5 a un 2% p/p y tiene una viscosidad en el rango de 500 a 8000 cP a temperatura ambiente. En una realización preferida, la composición de esta invención comprende un polisacárido de algas del género *Porphyridium*, que se disuelve en una solución salina, y tiene una concentración de un 0.5 a un 2% p/p y una viscosidad de 500 a 8000 cP, preferentemente a temperatura ambiente, y es resistente a la hialuronidasa *in vitro*.

25 Esta invención también se refiere al uso de dichos polisacáridos algáceos en la preparación de composiciones para tratar la artritis y otros trastornos de las articulaciones, preferentemente, osteoartritis, artritis reumatoide, gota, traumatismo, degeneración (relacionada con la edad), donde dicha composición es preferentemente una solución acuosa, atóxica y no inmunogénica con una concentración de dicho polisacárido de un 0.5 a un 2% p/p, y dichas articulaciones son cualquiera de rodilla, articulación de la cadera, hombro, tobillo, codo, articulación facetaria espinal o nudillo.

30 Las composiciones de acuerdo con la invención pueden comprender un analgésico, antiinflamatorio, antimicrobiano, antivírico, relajante muscular, sales, tampones o diluyentes. Dicha composición puede comprender además un medicamento requerido para tratar un trastorno concurrente, siendo dicho medicamento, por ejemplo, un antibiótico, antimicótico, corticoide, antialérgico, etc.

35 En una realización preferida de esta invención, la composición de viscosuplemento se inyecta a una articulación afectada, por ejemplo, en volúmenes de aproximadamente 0.1 a aproximadamente 5 ml. El polisacárido algáceo se puede suministrar a la articulación afectada en un volumen mayor de solución menos concentrada o en volumen menor de solución más concentrada. El agua se elimina de la articulación más rápido que el polisacárido y esto se puede tener en cuenta a la hora de planear el régimen. En el caso de un preparado más viscoso, se puede considerar emplear una dilución en solución salina e inyectar un mayor volumen. Cuando se determina el tamaño del volumen inyectado, el tamaño de la articulación tratada es uno de los factores que se deben tener en cuenta y los volúmenes de líquido sinovial, como bien sabrá el experto, también se pueden tener en cuenta. El viscosuplemento se puede suministrar en una porción o reiteradamente. En una realización, el líquido sinovial de una rodilla afectada por la artritis se extrae con una jeringa estéril y se inyecta 1 ml de una solución al 2 % del polisacárido de *Porphyridium sp.* en solución salina en esta rodilla, repitiendo este tratamiento opcionalmente.

45 Se descubrió que los polisacáridos de algas rojas presentaban actividades antiinflamatorias, antioxidantes [Matsui S. M. *et al.*: Biochem. Biotechnol. 104 (2003) 13-22; Tannin-Spitz T. *et al.*: J. Appl. Phycol. 17 (2005) 215-22] y emolientes, y además se descubrió que el polisacárido de *Porphyridium sp.* inhibía el virus del herpes simple de tipo 1 y 2, y el virus de la varicela-zóster *in vitro* sin efectos citotóxicos [Arad S. *et al.*: Recent Advances in Marine Biotechnology: Biomaterials from Aquatic and Terrestrial Organisms. (2005) (In Press)]. Estas propiedades pueden potenciar aun más las propiedades beneficiosas de los polisacáridos algáceos en su uso como viscosuplementos en el tratamiento de trastornos de las articulaciones. Esta invención proporciona también el uso de polisacáridos algáceos en el tratamiento de un trastorno de las articulaciones seleccionado entre osteoartritis, artritis reumatoide, gota, traumatismo,

degeneración (relacionada con la edad) o un tumor, que comprende i) preparar una composición que contiene un polisacárido algáceo resistente a la hialuronidasa; y ii) inyectar dicha composición en una articulación afectada, por ejemplo, en un volumen de aproximadamente 0.1 a aproximadamente 3 ml, en una porción o reiteradamente. Dicha articulación se selecciona entre rodilla, cadera, hombro, tobillo, codo, articulación facetaria espinal o nudillo. Dicha composición contiene un polisacárido algáceo en una solución acuosa en una concentración de aproximadamente un 0.5 a aproximadamente un 2% p/p, y tiene una viscosidad en el rango de aproximadamente 500 a aproximadamente 8000 cP a temperatura ambiente. El polisacárido es resistente a la hialuronidasa *in vitro* y se aísla de un alga del género *Porphyridium*. En algunas realizaciones del uso de polisacáridos algáceos en el tratamiento de trastornos de las articulaciones de acuerdo con esta invención, está implicado el uso simultáneo de un componente seleccionado entre un analgésico, antiinflamatorio, antimicrobiano, antivírico, anestésico, relajante muscular, sales, tampones o diluyentes. En otras realizaciones, se emplea un medicamento que se necesita para tratar un trastorno concurrente, dicho medicamento se selecciona entre un antibiótico, antimicótico, corticoide, antialérgico o antineoplásico. Dicha composición es esencialmente no inmunogénica y atóxica.

Esta invención también se refiere a un kit que comprende un equipo estéril para inyectar líquidos en articulaciones, una composición que actúa como viscosuplemento de acuerdo con esta invención y las instrucciones del proveedor.

La invención se describirá con más detalle y se ilustrará en los siguientes ejemplos.

Ejemplos

Cultivo de algas

Se cultivó *Porphyridium sp.* (UTEX 637) en un medio de agua de mar artificial (ASW, por sus siglas en inglés) en condiciones controladas y en un montaje a gran escala, como se indica a continuación. Se transfirió un trozo de agar inclinado de forma aséptica a cada Erlenmeyer estéril que contenía 100 ml de ASW. Los Erlenmeyers se mantuvieron en un recinto de crecimiento controlado sobre un agitador con luz suministrada desde arriba por luz fluorescente con una intensidad de aproximadamente $90 \mu\text{Em}^{-2}\text{s}^{-1}$, a una temperatura de $25 \pm 3^\circ\text{C}$. Después de 7-10 días, el volumen de cada Erlenmeyer se transfirió a una columna de vidrio. Las columnas se mantuvieron bajo la luz suministrada por un lateral con una intensidad de $150 \mu\text{Em}^{-2}\text{s}^{-1}$. Los cultivos se mezclaron con aire que contenía un 1-3% de CO_2 con una velocidad de flujo de 2 litros por minuto. Después de 3-6 días, una vez que el cultivo había alcanzado $20\text{-}50 \times 10^6$ células/ml, el volumen completo de cada columna se transfirió a una manga de polietileno. Cada manga se llenó hasta un volumen final de 3.0 litros de cultivo que contenía $5\text{-}8 \times 10^6$ células/ml. Las mangas se mantuvieron bajo la luz suministrada por un lateral con una intensidad de $150 \mu\text{Em}^{-2}\text{s}^{-1}$. Los cultivos se mezclaron con aire que contenía un 1-3% de CO_2 con una velocidad de flujo de 2 litros por minuto. Tras la fase logarítmica de crecimiento tuvo lugar la fase estacionaria durante la cual el polisacárido se acumuló en el medio de crecimiento. Después de 15-20 días, se recogió el polisacárido del medio enriquecido.

Aislamiento del polisacárido algáceo

Las células de las microalgas rojas están encapsuladas en un polisacárido sulfatado, cuya parte externa se disuelve en el medio. Cuando las algas se cultivan en un medio líquido, la viscosidad del medio aumenta debido a la disolución del polisacárido de la superficie celular. El volumen completo del cultivo en las mangas, como se obtuvo anteriormente, se transfirió a un recipiente grande. Las células se separaron del sobrenadante empleando centrifugación continua (Cepa Z-41 20 000 rpm), y se recogió el sobrenadante. El polisacárido se trata adicionalmente empleando tecnología de filtración de flujo cruzado para eliminar las sales y concentrar el polisacárido. El producto final tuvo una concentración > un 0.9% y una viscosidad > 1400 cP.

Propiedades del polisacárido algáceo

La concentración de los polisacáridos se determinó tomando una muestra de 0.5 ml de la solución de polisacárido con 9.5 ml de agua. Un preparado típico tenía un 0.9%-1% p/p de polisacárido con fenol en ácido sulfúrico de acuerdo con Dubois M. *et al.* [Anal. Chem. 28 (1956) 341-354].

La viscosidad se midió empleando un viscosímetro digital Brookfield, modelo DV-II. Se midió una muestra de 10 ml de polisacárido en un husillo n.º 25, con una velocidad de 30 rpm y a temperatura ambiente.

Se comprobó la toxicidad del polisacárido (irritación ocular) y se confirmó que era seguro para el uso en animales (Harlan Biotech Israel).

Modelo animal

Se empleó un modelo animal de resección del ligamento cruzado anterior (LCA) para inducir la osteoartritis experimental en conejos. Resumiendo, después de anestesiarse y preparar dos rodillas, se realizó una incisión longitudinal en la piel de aproximadamente 3 cm medial al tendón patelar. Tras abrir la cápsula articular, el LCA se extirpó macroscópicamente. La inestabilidad se confirmó manualmente llevando a cabo la prueba del cajón anterior. El espacio articular se purgó con solución salina y se suturó. Los animales recibieron analgésicos posoperatorios.

Ejemplo 1

Se emplearon un polisacárido algáceo y un hialuronano comercializado como viscosuplemento en un modelo en conejos. Se preparó el polisacárido algáceo al 1% p/p en solución salina, pH 6.5-7.5, como se describió anteriormente, se obtuvo hialuronano al 1% p/p, ambos preparados eran estériles. Se trataron seis conejos como se describió anteriormente. Empezando una semana después de la resección del LCA, se administraron inyecciones intraarticulares una vez a la semana durante tres semanas consecutivas como se indica a continuación: se inyectó el preparado de hialuronano (0.1 cc) en una rodilla, mientras que en la otra rodilla se inyectó el polisacárido algáceo (0.1 cc). Se sacrificaron tres conejos a las 6 semanas y el resto de los animales se sacrificaron después de 12 semanas. Las articulaciones de la rodilla se diseccionaron y se sometieron a un examen histopatológico de acuerdo con el criterio de Mankin modificado [Clinical Orthopedic Research 298 (1994) 296-304]. Los cambios degenerativos fueron más marcados en las rodillas tratadas con el material de control.

Ejemplo 2

La población del estudio comprendía 22 ovejas Awassi sanas de dos años de edad. La osteoartritis se indujo llevando a cabo una menisectomía lateral con anestesia general en ambas babillas de cada animal. Se dejó que las ovejas deambularan libremente durante las primeras 16 semanas después de la cirugía, con acceso libre a comida y bebida. Pasadas 16 semanas, todos los animales cojeaban. A las 16 semanas, se administraron inyecciones intraarticulares a las ovejas de un polisacárido microalgáceo o Arthrease de acuerdo con el siguiente protocolo:

Tabla 2. Protocolo del estudio

Número del grupo	Rodilla derecha	Rodilla izquierda
1 (8 animales)	Una sola inyección de polisacárido	Solución salina
2 (7 animales)	Una sola inyección de polisacárido	Una sola inyección de Arthrease una vez por semana durante tres semanas
3 (7 animales)	Una sola inyección de polisacárido una vez por semana durante 3 semanas	Una sola inyección de Arthrease una vez por semana durante tres semanas

Para las inyecciones, el acceso a cada articulación fue medial. El procedimiento se llevó a cabo con anestesia general en un quirófano. Después de las inyecciones, se devolvieron las ovejas a la granja hasta el final del estudio, que duró un total de 36 semanas. Al final de este periodo, los animales se sacrificaron y se diseccionaron sus rodillas. Una vez diseccionadas, las rodillas se evaluaron en un sistema de clasificación según el deterioro del cartílago, que clasifica el deterioro del cartílago articular desde 0 (cartílago normal), pasando por varios estados de deterioro, hasta 5 (pérdida del cartílago y exposición del hueso). Tras diseccionar y evaluar el deterioro global de las rodillas, las superficies articulares se descalcificaron, y se prepararon dos láminas para cada superficie articular. Las láminas se tiñeron con hematoxilina y eosina, y se clasificaron de acuerdo con una puntuación de Mankin adaptada, que evalúa el deterioro del cartílago.

Resultados-Evaluación macroscópica

Se llevó a cabo un análisis pareado para cada grupo por separado, comparando la babilla derecha con la izquierda. La observación global mostró que la puntuación global fue mayor para las rodillas tratadas con polisacárido en los grupos 2 y 3 que en las rodillas opuestas tratadas con tres inyecciones de Arthrease, pero no se detectaron diferencias significativas desde un punto de vista estadístico entre los grupos. Para evaluar la influencia del polisacárido y la Arthrease en articulaciones con un deterioro menos grave, la evaluación se repitió, con un análisis pareado, excluyendo los especímenes clasificados como estado 4 y 5. Nuevamente, no se detectaron diferencias significativas desde un punto de vista estadístico entre los grupos. El análisis no pareado comparó una única inyección o tres inyecciones de polisacáridos con el subgrupo de animales que recibieron tres inyecciones de Arthrease (grupos 2 y 3). La observación global mostró que la puntuación global para las articulaciones tratadas con tres inyecciones de Arthrease (grupos 2 y 3) fue mayor (es decir, peor) que la de las articulaciones tratadas con inyecciones de polisacárido (grupos 2 y 3). Nuevamente, no se detectaron diferencias significativas desde un punto de vista estadístico.

Resultados-Evaluación microscópica

Se llevó a cabo un análisis pareado para cada grupo por separado, en el cual la babilla derecha se comparó con la babilla izquierda. La puntuación global fue mayor para las rodillas tratadas con polisacáridos en el grupo 2 en comparación con las rodillas opuestas tratadas con tres inyecciones de Arthrease. Los grupos 1 y 3 mostraron unos promedios ligeramente mejores en las babillas izquierdas que en las derechas, que habían sido tratadas con inyecciones de Arthrease. No se detectaron diferencias significativas desde un punto de vista estadístico entre los grupos. El análisis no pareado comparó articulaciones tratadas con una única inyección de polisacárido con las tratadas con tres inyecciones de Arthrease (grupos 1 y 2 derecha frente a los grupos 2 y 3 izquierda). La puntuación global para las rodillas tratadas con polisacárido fue menor (es decir, mejor) que para las rodillas tratadas con Arthrease, aunque no se detectaron diferencias significativas desde un punto de vista estadístico. Para evaluar la influencia del polisacárido y la

Arthrease en articulaciones con un deterioro menos grave, la evaluación se repitió excluyendo los especímenes clasificados como estados 4 y 5. El análisis no pareado mostró que la puntuación global para las rodillas tratadas con polisacárido era menor (es decir, mejor) que para las rodillas tratadas con Arthrease, aunque no se detectaron diferencias significativas desde un punto de vista estadístico.

5 **Ejemplo 3**

10

El polisacárido de *Porphyridium sp.* fue resistente a la hialuronidasa *in vitro*. Se introdujo 1 ml de sustrato al 0.02% en peso (ácido hialurónico o polisacárido algáceo) en tampón fosfato 0.1 M que contenía cloruro de sodio 0.15 M, pH 5.45, en un viscosímetro Oswald, en un baño termostático a 37 °C. Tras incubar durante 5 min, se agregó la hialuronidasa de mamífero (Sigma, H-4272) en la misma solución tampón (concentración 0.2 mg/ml) al viscosímetro, y se comenzó a contar el tiempo de reacción. El tiempo de salida de la mezcla de reacción del depósito del viscosímetro se determinó para los tiempos de reacción 4, 8, 15, 20 y 30 min. A pesar de que la viscosidad del ácido hialurónico decrecía de forma continua, la viscosidad del polisacárido algáceo permaneció esencialmente invariable.

REIVINDICACIONES

1. Una composición que actúe como viscosuplemento para su uso en inyecciones en una articulación, que contiene un polisacárido de una microalga roja, donde dicha microalga roja es del género *Porphyridium*.
- 5 2. Una composición de acuerdo con la reivindicación 1, que comprende el polisacárido algáceo en una solución acuosa con una concentración de un 0.5 a un 2% p/p y con una viscosidad de 500 a 8000 cP a temperatura ambiente.
3. Una composición de acuerdo con la reivindicación 1, donde el polisacárido es resistente a la hialuronidasa *in vitro*.
4. Una composición de acuerdo con la reivindicación 1, que comprende además al menos un analgésico, antiinflamatorio, antimicrobiano, antioxidante, antiviral, anestésico, relajante muscular, sales, tampones y/o diluyentes.
- 10 5. Una composición de acuerdo con la reivindicación 1, que comprende además un medicamento necesario para tratar un trastorno concurrente, siendo dicho medicamento seleccionado entre un antibiótico, antimicótico, corticoide, antialérgico o antineoplásico.
6. Una composición de acuerdo con la reivindicación 1, que es no inmunogénica y atóxica.
7. El uso de un polisacárido de una microalga roja del género *Porphyridium* en la preparación de una composición que actúe como viscosuplemento para tratar un trastorno de las articulaciones.
- 15 8. El uso de acuerdo con la reivindicación 7, donde dicho trastorno se selecciona entre artritis, gota, traumatismo y degeneración.
9. El uso de acuerdo con la reivindicación 8, donde dicha artritis es osteoartritis o artritis reumatoide.
10. El uso de acuerdo con la reivindicación 7, que comprende inyectar la composición en una articulación.
- 20 11. El uso de acuerdo con la reivindicación 10, donde dicha articulación se selecciona entre rodilla, cadera, hombro, tobillo, codo, articulación facetaria espinal y nudillo.
12. El uso de acuerdo con la reivindicación 10, donde dicha composición se inyecta en un volumen de 0.3 a 3 ml.
13. El uso de acuerdo con la reivindicación 10, donde dicha composición se inyecta en una porción o reiteradamente.
14. Una composición que actúe como viscosuplemento para su uso como en la reivindicación 1 contenida en un kit que comprende un equipo estéril para inyectar líquidos en una articulación y las instrucciones del proveedor.