(19) OFICINA ESPAÑOLA DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

(11) Número de publicación: **2 427 730**

(51) Int. Cl.:
A61L 27/20 (2006.01)

(12) TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA T3

(96) Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **19.08.2008** **E 08792674 (7)**

(97) Fecha y número de publicación de la concesión europea: **24.07.2013** **EP 2210621**

(54) Título: **Composición para el tratamiento de la artritis reumatoide**

(30) Prioridad:

24.10.2007 JP 2007277005
21.02.2008 WO PCT/JP2008/052999

(45) Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
31.10.2013

(73) Titular/es:

MOCHIDA PHARMACEUTICAL CO., LTD. (50.0%)
7, Yotsuya 1-chome Shinjuku-ku
Tokyo 160-8515, JP y
NATIONAL UNIVERSITY CORPORATION HOKKAIDO UNIVERSITY (50.0%)

(72) Inventor/es:

IWASAKI, NORIMASA;
MINAMI, AKIO;
KASAHARA, YASUHIKO;
IGARASHI, TATSUYA;
KAWAMURA, DAISUKE;
OHZAWA, NOBUO y
IMAI, MARIKO

(74) Agente/Representante:

CARPINTERO LÓPEZ, Mario

ES 2 427 730 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

Composición para el tratamiento de la artritis reumatoide

CAMPO TÉCNICO

La presente invención se refiere a una composición para su uso en el tratamiento de una enfermedad de las articulaciones, que incluye aplicaciones veterinarias.

ANTECEDENTES DE LA INVENCIÓN

Por ejemplo, el cartílago articular es cartucho hialino que está compuesto por un pequeño número de células, matriz extracelular colagenosa, abundantes proteoglucanos y agua. En el caso del hueso, como están presentes redes vasculares y neurales y el hueso tiene la capacidad de auto-repararse, aunque se haya producido una fractura, la fractura se repara frecuentemente completamente. Sin embargo, el cartílago articular carece de redes vasculares y neurales. Por consiguiente, prácticamente no tiene posibilidades de auto-repararse, y en el caso de formación de grandes defectos de cartílago en particular, el defecto de cartílago no se repara adecuadamente. Incluso en aquellas porciones que están reparadas, se forma cartílago fibroso que tiene diferentes propiedades mecánicas al cartílago hialino. Por consiguiente, cuando se forma un defecto de cartílago, se provoca dolor de las articulaciones y pérdida de función que frecuentemente progresan a osteoartritis. Además, un defecto de cartílago puede alcanzar un amplio intervalo como resultado de síntomas que progresan desde las etapas iniciales de osteoartritis que empezaron con el desgaste de la superficie del cartílago articular debido a envejecimiento o excesivo uso de las articulaciones.

Aunque la osteoartritis (OA) es una enfermedad degenerativa en la que el cartílago articular se desgasta debido a envejecimiento y excesivo uso de las articulaciones, además de la causa mecánica del desgaste, también se dice que respuestas inflamatorias locales, tales como la producción de citocinas inflamatorias por células sinoviales y condrocitos y la inducción de sustancias algésicas y proteasas por citocinas inflamatorias, participan en la destrucción de la articulación. Concretamente, acompañando al desgaste de cartílago articular (daño mecánico), se induce una respuesta inflamatoria dentro del tejido de la articulación, el daño al cartílago autodestructivo progresa debido a esta respuesta inflamatoria y el daño mecánico progresa adicionalmente debido a la reducida función de la articulación, produciendo así un ciclo vicioso que agrava adicionalmente la enfermedad. El tratamiento de la osteoartritis se basa principalmente en la eliminación de dolor e inflamación en el área afectada, y en el extranjero se trata comúnmente con administración de fármacos antiinflamatorios no esteroideos. Sin embargo, como la función renal puede debilitarse en pacientes ancianos, la administración continua por vía oral de fármacos antiinflamatorios no esteroideos puede ser difícil desde el punto de vista de la seguridad. Los productos que incorporan ácido hialurónico, que es un componente de líquido sinovial de cartílago, mejoran la función lubricante de las articulaciones al administrarse a una articulación , y como estos productos también tienen acción analgésica, se usan ampliamente como agentes de mejoran la función de la articulación para osteoartritis. Sin embargo, en casos graves de osteoartritis asociados a degeneración avanzada de cartílago y tejido de alrededor, finalmente no hay otra elección, sino sustituir la articulación con una articulación artificial, haciendo así que esta sea una de las enfermedades para las que hay una necesidad de desarrollar un fármaco terapéutico novedoso que inhiba y finalmente mejore el avance de la degeneración de tejido (Referencia 1).

Aunque el mecanismo de aparición de la artritis reumatoide (AR) no se entiende completamente, se ha informado que implica inflamación y crecimiento anormal de la membrana sinovial y una respuesta inmunitaria excesiva mediada por linfocitos T activados, produciendo la progresiva destrucción de tejido de la articulación. Aunque la AR muestra síntomas que se parecen a OA con respecto a estar asociada a la degeneración de tejido de la articulación, la AR es un tipo de enfermedad autoinmunitaria, y tiene una patología diferente a la de la OA. Recientemente, preparaciones biológicas han llegado a usarse como fármacos terapéuticos para AR dirigidos a una citocina inflamatoria en forma de TNF-α. Estas preparaciones tienen como principios activos de las mismas anticuerpos anti TNF-α o receptores de TNF, y se cree que contribuyen a la prevención de la destrucción de la articulación, inhibiendo la función de TNF-α. Por otra parte, como estas preparaciones inhiben la función de TNF-α sistémicamente, efectos adversos graves, que incluyen enfermedades infecciosas tales como neumonía y tuberculosis, presentan problemas clínicamente. Así, existe la necesidad de un fármaco terapéutico novedoso que sea altamente seguro y que pueda inhibir la progresión de la artritis reumatoide.

El ácido algínico es un polisacárido de alto peso molecular presente en grandes cantidades en algas marrones que es un polímero obtenido polimerizando linealmente dos tipos de ácidos urónicos en forma de ácido D-manurónico (M) y ácido L-glurónico (G). Además de presentar viscosidad cuando está en soluciones, ya que el ácido algínico también tiene la propiedad de gelificar en presencia de un catión que tiene una valencia de 2 o más, se usa ampliamente como espesante o agente gelificante en alimentos, cosméticos y materiales base de preparaciones farmacéuticas. Ha llegado a usarse una tecnología que utiliza esta propiedad gelificante del ácido algínico por la que se producen perlas incorporadas con células añadiendo gota a gota una soluciones de ácido algínico con células suspendidas en su interior a una soluciones de iones calcio. Se han hecho intentos por incorporar condrocitos y similares en tales perlas, seguido de trasplante a lesiones por daño al cartílago. La Referencia 2 proporciona una discusión que indica que el

ácido algínico puede usarse como vehículo sin que tenga ningún efecto desventajoso sea cual fuere la lesión por daño al cartílago, y que el ácido algínico por sí mismo no tiene ningún efecto terapéutico. Además, la Referencia 3 desvela que, aunque se formó tejido de cartílago normal en un injerto tras la suspensión de condrocitos en una soluciones de alginato de sodio, inyección en un defecto de cartílago de conejo y curado de la superficie con soluciones de $CaCl_2$, se forma cartílago fibroso en el caso de aplicar solo ácido algínico al defecto de cartílago sin que contenga células en su interior. La Referencia 4 desvela una composición de ácido algínico autogelificante curable que comprende una mezcla de una sal de ácido algínico soluble y una sal/gel de ácido algínico insoluble, que contiene condrocitos y se inyecta en un defecto de cartílago. La Referencia 5 desvela un ácido hialurónico inyectable para el tratamiento de enfermedades de las articulaciones.

De este modo, el ácido algínico es conocido por ser un biopolímero que puede usarse como vehículo de condrocitos y similares, y se ha intentado usar como vehículo de trasplante que se inyecta en un defecto de cartílago junto con células y luego se cura aprovechando su capacidad de gelificación. Sin embargo, los efectos terapéuticos de una composición de ácido algínico que no contiene células son desconocidos, y todavía tiene que intentarse la aplicación de una composición de ácido algínico no curable a enfermedad de las articulaciones.

[REFERENCIAS]

1. Harumoto Yamada y col., “Drug therapy for osteoarthritis”, Clin. Rheumatol., vol. 18, 2006: pág. 298-306

2. Cay M. Mierisch y col., “Transforming Growth Factor-β in Calcium Alginate Beads for the Treatment of Articular Cartilage Defects in the Rabbit”, The Journal of Arthroscopic and Related Surgery, vol. 18, nº 8 (octubre), 2002: pág. 892-900

3. E. Fragonas y col., “Articular Cartilage Repair in Rabbits by Using Suspensions of Allogenic Chondrocytes in Alginate”, Biomaterials, vol. 21, 2000: pág. 795-801

4. WO 2006/044342

5. EP-A-1496037

DIVULGACIÓN DE LA INVENCIÓN

Se requieren fármacos terapéuticos para osteoartritis que proporcionen efectos completos, que incluyen efectos que protegen el cartílago del desgaste, efectos que inhiben cambios degenerativos en el cartílago producidos por desgaste e inflamación, efectos que reparan la lesión por daño al cartílago y efectos que suprimen la inflamación y dolor. Si pudiera obtenerse un fármaco que pudiera inhibir la inflamación y suprimir el dolor en las articulaciones, podría aplicarse al tratamiento de hombro congelado y supresión del dolor de las articulaciones en la artritis reumatoide crónica. Se requiere que los fármacos terapéuticos para la artritis reumatoide tengan efectos terapéuticos tales como inhibir la proliferación anormal de células sinoviales e inhibir la destrucción de tejido osteocondral que acompaña a una excesiva respuesta inmunitaria, mientras que también sean altamente seguros con pocos efectos adversos. Como la AR es una enfermedad autoinmunitaria, es difícil de evitar efectos adversos inmunosupresores cuando se intenta obtener efectos terapéuticos. Aunque las preparaciones de ácido hialurónico son conocidas por tener un grado comparativamente alto de seguridad entre los productos farmacéuticos que pueden usarse para AR, la inyección intraarticular de ácido hialurónico se usa con el fin de suprimir dolor en AR, y no se considera que sea un agente terapéutico para AR. Concretamente, la cuestión es proporcionar un fármaco novedoso que pueda realizar tanto efectos terapéuticos para AR como un alto grado de seguridad.

Los inventores de la presente invención realizaron amplios estudios para resolver los problemas anteriormente mencionados. Se encontró que inyectando intra-articularmente una composición que contiene una sal metálica monovalente de ácido algínico en la que el nivel de endotoxinas se había reducido a un grado de manera que sustancialmente no produjera inflamación o fiebre, y que no contiene el uso de un agente, se inhiben cambios degenerativos del cartílago y se obtienen efectos que protegen al cartílago en un modelo de osteoartritis experimental. Además, se encontró que esta composición tiene el efecto de suprimir dolor en un modelo de dolor por artritis experimental. Además, también se encontró que esta composición tiene el efecto de inhibir la destrucción y degeneración de tejido osteocondral e inhibir la degeneración de tejido sinovial en un modelo de artritis reumatoide experimental, conduciendo así a la completitud de la presente invención.

Este es el primer caso en el que se ha demostrado que una sustancia distinta de ácido hialurónico, que es un componente principal del líquido sinovial, tiene efectos compuestos sobre tejido de cartílago de este modo en osteoartritis. Fue sorprendente encontrar que el ácido algínico, que es un polímero que se origina en algas y no está inherentemente presente en animales, tiene efectos tales como estos. La artritis reumatoide es un tipo de enfermedad autoinmunitaria y tiene una patología diferente a la osteoartritis. En la artritis reumatoide, los fármacos que tienen la función de “fármaco modificador de la enfermedad” que inhibe la degeneración y destrucción de tejido de la articulación consisten principalmente en inmunomoduladores que actúan sistémicamente en el modo de anticuerpos anti-TNFα y

metrotrexato. Aunque el ácido hialurónico, que es un polisacárido similar a ácido algínico, es un agente terapéutico para osteoartritis, solo se usa en terapia sintomática para el dolor de las articulaciones en la artritis reumatoide. Así, aún cuando los efectos terapéuticos han sido obtenidos para osteoartritis con ácido algínico, fue difícil predecir si tenía o no efectos terapéuticos en la artritis reumatoide. Fue, por tanto, sorprendente encontrar que un polímero de polisacárido altamente seguro y que se produce naturalmente similar al ácido algínico, comúnmente usado en alimentos y bases farmacéuticas, funcione como fármaco modificador de la enfermedad de artritis reumatoide por inyección intra-articular.

Concretamente, la presente invención proporciona una composición que permite obtener efectos terapéuticos inyectando en una articulación de un paciente que tiene una enfermedad de las articulaciones.

(1-1) Una composición que contiene como principio activo una sal metálica monovalente de baja endotoxina de ácido algínico, pero que no contiene un agente de curado para la sal metálica monovalente de ácido algínico, para su uso en el tratamiento de la artritis reumatoide, en la que la composición es adecuada para ser inyectada en una articulación.

(1-2) La composición para su uso en el tratamiento de la artritis reumatoide de (1-1) anterior, que es para su uso en la inhibición de la degeneración de tejido sinovial en la artritis reumatoide.

(1-3) La composición para su uso en el tratamiento de la artritis reumatoide de (1-1) anterior, que es para su uso en la inhibición de la destrucción de la articulación en la artritis reumatoide.

(1-4) La composición para su uso en el tratamiento de la artritis reumatoide de (1-1) anterior, en la que la composición no contiene células.

(1-5) La composición para su uso en el tratamiento de la artritis reumatoide de (1-1) anterior, en la que la sal metálica monovalente de baja endotoxina de ácido algínico tiene un peso molecular ponderado medio de 500.000 o más como se ha determinado por cromatografía de filtración en gel.

Además, la presente invención proporciona lo siguiente:

(2-1) El uso de una sal metálica monovalente de baja endotoxina de ácido algínico para la fabricación de un medicamento para el tratamiento de la artritis reumatoide, en el que el medicamento es para inyección en una articulación y no contiene un agente de curado para la sal metálica monovalente de ácido algínico.

(2-2) El uso de (2-1) anterior, en el que el medicamento es para la inhibición de la degeneración de tejido sinovial en la artritis reumatoide.

(2-3) El uso de (2-1) anterior, en el que el medicamento es para la inhibición de la destrucción de la articulación en la artritis reumatoide.

(2-4) El uso de (2-1) anterior, en el que el medicamento no contiene células.

(2-5) El uso de (2-1) anterior, en el que la sal metálica monovalente de baja endotoxina de ácido algínico tiene un peso molecular ponderado medio de 500.000 o más como se ha determinado por cromatografía de filtración en gel.

La composición para tratar la artritis reumatoide de la presente invención puede inhibir la progresión de la enfermedad y síntomas asociados, y alivia o cura síntomas de la misma, inyectándola en una articulación en un estado líquido. Un aspecto de la composición de la presente invención demuestra efectos reparadores, protectores e inhibidores de la degeneración sobre el daño mecánico de cartílago mientras que también inhibe reacciones inflamatorias y dolor en tejido de la articulación. Además, la composición demuestra efectos terapéuticos para la destrucción de la articulación inhibiendo la degeneración de tejido sinovial que acompaña a una respuesta autoinmunitaria e inhibiendo destrucción osteocondral. La composición contribuye a mejorar la función de la articulación en la artritis reumatoide mediante estos efectos combinados. En particular, la composición es útil en el alivio del dolor de la articulación en la artritis reumatoide, y tratamiento de la artritis reumatoide.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

La FIG. 1 es un diagrama que muestra los criterios para puntuar observaciones globales en un modelo de reparación de cartílago de conejo del Ejemplo 1.

La FIG. 2 es un diagrama que muestra los criterios para puntuar los resultados de tinción en un modelo de reparación de cartílago de conejo del Ejemplo 1.

La FIG. 3 muestra fotografías de tinción de tejido de un grupo de control A) (vacío) en un modelo de reparación de

cartílago de conejo del Ejemplo 1. La FIG. 3A muestra los resultados después de 4 semanas mientras que la FIG. 3B muestra los resultados después de 12 semanas. Los resultados se muestran para, de izquierda a derecha, tinción con H-E, tinción con safranina O e inmunotinción con colágeno tipo I y colágeno tipo II.

La FIG. 4 muestra fotografías de tinción de tejido de un grupo C) de alginato de calidad alimentaria + células en un modelo de reparación de cartílago de conejo del Ejemplo 1. La FIG. 4A muestra los resultados después de 4 semanas mientras que la FIG. 4B muestra los resultados después de 12 semanas. Los procedimientos de tinción son los mismos que aquellos de la FIG. 3.

La FIG. 5 muestra fotografías de tinción de tejido de un grupo D) de alginato purificado (sin células) en un modelo de reparación de cartílago de conejo del Ejemplo 1. La FIG. 5A muestra los resultados después de 4 semanas mientras que la FIG. 5B muestra los resultados después de 12 semanas. Los procedimientos de tinción son los mismos que aquellos de la FIG. 3.

La FIG. 6 muestra fotografías de tinción de tejido de un grupo E) de alginato purificado + células en un modelo de reparación de cartílago de conejo del Ejemplo 1. La FIG. 6A muestra los resultados después de 4 semanas mientras que la FIG. 6B muestra los resultados después de 12 semanas. Los procedimientos de tinción son los mismos que aquellos de la FIG. 3.

La FIG. 7 muestra los resultados de observaciones globales de puntuación y tinción en un modelo de reparación de cartílago de conejo del Ejemplo 1.

La FIG. 8 es una gráfica que muestra los resultados de medir la resistencia mecánica para los grupos D) y E) de alginato purificado en un modelo de reparación de cartílago de conejo del Ejemplo 1.

La FIG. 9 muestra fotografías del aspecto de articulaciones de la rodilla en un modelo de osteoartritis de conejo del Ejemplo 3.

La FIG. 10 muestra fotografías de tinción de tejido de tejido de la articulación de la rodilla en un modelo de osteoartritis de conejo del Ejemplo 3.

La FIG. 11 muestra fotografías del aspecto de articulaciones de la rodilla en un modelo de osteoartritis de conejo del Ejemplo 4 después de tinción con tinta india. En las fotografías, las áreas rodeadas indican límites entre lesiones por daño al cartílago teñidas con tinta india y cartílago normal. A) Grupo de control; B) Grupo de dosis de 1 % de hialuronato de sodio; C) Grupo de dosis de 2 % de alginato de sodio (peso molecular: 400.000); D) Grupo de dosis de 2 % de alginato de sodio (peso molecular: 1.000.000); E) Grupo de dosis de 2 % de alginato de sodio (peso molecular: 1.700.000). Además, las fotografías muestran ejemplos de múltiples especímenes.

La FIG. 12 muestra los resultados de puntuación de hallazgos macroscópicos de articulaciones de la rodilla teñidas con tinta india en un modelo de osteoartritis de conejo del Ejemplo 4. NS, HA, AL40, AL100 y AL170 se corresponden respectivamente con A) a E) (mismo que la FIG. 11). Grado 1 indica una superficie no dañada no teñida con tinta india (sin captación de tinta india, que indica superficie intacta). Grado 2 indica tinción focal con tinta india y lesión leve a la superficie (captación focal mínima de tinta india, leve irregularidad de la superficie). Grado 3 indica gran tinción bien definida con tinta india y fibrilación obvia (parches oscuros focales grandes evidentes de tinta india, fibrilación manifiesta). Grado 4a indica erosión del cartílago inferior a 2 mm (erosión de cartílago <2 mm). Grado 4b indica erosión del cartílago de 2 a 5 mm (erosión de cartílago 2-5 mm). Grado 4c indica erosión de cartílago superior a 5 mm (erosión de cartílago >5 mm).

La FIG. 13 muestra fotografías de tinción de tejido de la articulación de la rodilla con safranina O en un modelo de osteoartritis de conejo del Ejemplo 4. A) a E) son los mismos que en la FIG. 11. Además, las fotografías muestran ejemplos de múltiples especímenes.

La FIG. 14 muestra los resultados de puntuación de evaluaciones histopatológicas generales en un modelo de osteoartritis de conejo del Ejemplo 4. NS, HA, AL40, AL100 y AL170 se corresponden respectivamente con A) a E) (mismo que en la FIG. 11).

La FIG. 15 muestra cambios basados en el tiempo en puntuaciones de marcha en un modelo de dolor por artritis experimental de rata del Ejemplo 6. A) Grupo de control (NS); B) Grupo de dosis de 1 % de hialuronato de sodio (1 % de HA); C) Grupo de dosis de 2 % de alginato de sodio (peso molecular: 1.000.000) (2 % de AL100); D) Grupo de dosis de 1 % de alginato de sodio (peso molecular: 1.700.000) (1 % de AL170); E) Grupo de dosis de 2 % de alginato de sodio (peso molecular: 1.700.000) (2 % de AL170). *: $p<0,05$ frente a NS.

La FIG. 16 muestra una fotografía de cabezas humerales en un modelo de rotura del manguito de los rotadores de conejo del Ejemplo 7. La fecha negra indica lesiones por daño al cartílago. “Control” indica un grupo de dosis de solución salina fisiológica, mientras que “Alginato” indica un grupo de dosis de ácido algínico.

La FIG. 17 es una gráfica que muestra coeficientes de fricción de especímenes de la articulación de la rodilla de un modelo de osteoartritis de conejo del Ejemplo 8. Los coeficientes de fricción se representan sobre el eje vertical. “Control (normal)” indica una articulación normal, “HA(OA)” indica una articulación con OA administrada con ácido hialurónico y “AL100(OA)” indica una articulación con OA administrada con ácido algínico.

La FIG. 18 es una gráfica que muestra cambios basados en el tiempo en el grado de artritis tras la sensibilización con antígeno en un modelo de artritis inducida por colágeno de rata del Ejemplo 9. Las puntuaciones de artritis se representan en el eje vertical, mientras que el número de días después de la sensibilización con antígeno se representa en el eje horizontal. A) indica un grupo de control, B) un grupo de dosis de 1 % de hialuronato de sodio, C) un grupo de dosis de 2 % de alginato de sodio (peso molecular: 1.000.000), D) un grupo de dosis de 1 % de alginato de sodio (peso molecular: 1.700.000) y E) un grupo de dosis de 2 % de alginato de sodio (peso molecular: 1.700.000).

La FIG. 19 muestra los resultados de puntuaciones de evaluaciones histológicas de tejido sinovial de la articulación de la rodilla en un modelo de artritis inducida por colágeno de rata del Ejemplo 9. A a E representan los mismos grupos que en la FIG. 18. *: $p<0,05$ frente a control

La FIG. 20 muestra los resultados de puntuaciones de evaluaciones histológicas de la rótula de la articulación de la rodilla en un modelo de artritis inducida por colágeno de rata de la FIG. 9. A a E representan los mismos grupos que en la FIG. 18. *: $p<0,05$ frente a control

La FIG. 21 muestra los resultados de puntuaciones de evaluaciones histológicas del cóndilo femoral lateral de la articulación de la rodilla en un modelo de artritis inducida por colágeno de rata del Ejemplo 9. A a E representan los mismos grupos que en la FIG. 18. *: $p<0,05$ frente a control

MEJOR MODO PARA LLEVAR A CABO LA INVENCIÓN

Aunque lo siguiente proporciona una explicación detallada de la presente invención, las siguientes realizaciones pretenden ser a modo de ejemplo para explicar la presente invención, y la presente invención puede llevarse a cabo en diversas formas sin desviarse del objeto de la misma.

1. Introducción

El “cartílago” se encuentra en articulaciones; pared torácica; discos intervertebrales; menisco; estructura tubular tal como garganta, tubo respiratorio y orejas, etc., y se clasifica en tres tipos que consiste en cartílago hialino, cartílago elástico y cartílago fibroso. Por ejemplo, el cartílago articular se clasifica como cartílago hialino, está compuesto por condrocitos, matriz extracelular colagenosa, proteoglucano y agua, y está libre de intervención vascular. El cartílago hialino es rico en colágeno de tipo II, y se tiñe por anticuerpos para colágeno de tipo II. También se caracteriza por ser teñido de rojo por tinción con safranina O usada para teñir proteoglucano. Un “daño al cartílago” se refiere a un estado en el que el cartílago se ha dañado debido a envejecimiento, traumatismo u otros factores, e incluye un estado en el que la función del cartílago ha disminuido, tal como una disminución en la viscoelasticidad característica del cartílago (que permite que el cartílago se comprima lentamente cuando se somete a una carga y luego vuelve lentamente a su estado original cuando se elimina la carga), provocando así la alteración de la capacidad del cartílago para soportar una carga, mientras que se mantiene la movilidad. El daño al cartílago también puede observarse en enfermedad tal como osteoartritis y la artritis reumatoide.

En la presente invención, “enfermedad de las articulaciones” se refiere a una enfermedad que se produce debido a cartílago, tejido de cartílago y/o tejido de la articulación (tal como la membrana sinovial, cápsula articular o hueso subcondral) que se ha dañado por irritación mecánica o respuesta inflamatoria. “Tratamiento de enfermedad de las articulaciones” se refiere a aliviar, mejorar y/o curar diversos síntomas de tejido que han sido dañados por irritación mecánica o respuesta inflamatoria. Por ejemplo, en casos de osteoartritis, hay aparición compuesta de síntomas tales como desgaste del cartílago articular, degeneración de tejido del cartílago, inflamación de la membrana sinovial o dolor asociado a inflamación. Por otra parte, en casos de hombro congelado, los síntomas consisten principalmente en inflamación de la membrana sinovial y la cápsula articular, además de dolor asociado a la misma, mientras que pueden no observarse desgaste y degeneración de cartílago. Aunque el mecanismo de manifestación de la artritis reumatoide no se entiende completamente, se cree que el tejido sinovial y el tejido de cartílago son destruidos por citocinas inflamatorias resultantes de una respuesta autoinmunitaria. De este modo, la enfermedad de las articulaciones es una enfermedad que se presenta con síntomas compuestos, y se requiere que fármacos para el tratamiento de la misma tengan efectos compuestos, que incluyen protección de cartílago del desgaste, inhibición de cambios degenerativos en el cartílago debido al desgaste o inflamación, reparación de lesiones por daño al cartílago, inhibición de la inflamación y dolor, inhibición de la degeneración de tejido sinovial e inhibición de destrucción osteocondral. La “composición que contiene una sal metálica monovalente de baja endotoxina de ácido algínico” de la presente invención tiene los efectos de proteger al cartílago de la irritación mecánica, inhibir cambios degenerativos en el cartílago producidos por desgaste o inflamación, reparar lesiones por daño al cartílago, inhibir la inflamación y dolor de tejido de la articulación, inhibir la

degeneración de tejido sinovial e inhibir la destrucción osteocondral. Como resultado, la composición puede inhibir el progreso de la enfermedad de las articulaciones, y aliviar, mejorar y/o curar síntomas. En particular, la composición es útil para tratar osteoartritis, tratar hombro congelado, aliviar el dolor de las articulaciones asociado a la artritis reumatoide y tratar la artritis reumatoide.

Además, “inyectar en una articulación” se refiere a inyección de una composición líquida que tiene fluidez en, por ejemplo, una cavidad articular, bolsa sinovial o peritenón. En el caso de uso para tratar osteoartritis y artritis reumatoide, la composición se inyecta preferentemente en una cavidad articular. Además, aunque la osteoartritis y la artritis reumatoide pueden producirse en diversas articulaciones del cuerpo, que incluyen aquellas de las rodillas, hombros, caderas, espalda baja, tobillos, muñecas y dedos, la composición de la presente invención puede aplicarse a cualquiera de estas articulaciones.

2. Sal metálica monovalente de ácido algínico

La “sal metálica monovalente de ácido algínico” contenida en la composición para tratar una enfermedad de las articulaciones de la presente invención es una sal soluble en agua formada por intercambio iónico entre un átomo de hidrógeno de ácido carboxílico en la posición 6 del ácido algínico y un ión de metal monovalente tal como Na^+ o K^+. Aunque ejemplos específicos de sales metálicas monovalentes de ácido algínico incluyen alginato de sodio y alginato de potasio, el alginato de sodio adquirible como producto comercialmente disponible es particularmente preferible.

El “ácido algínico” usado en la presente invención es un polisacárido biodegradable de alto peso molecular que es un polímero obtenido polimerizando linealmente dos tipos de ácidos urónicos en forma de ácido D-manurónico (M) y ácido L-glurónico (G). Más específicamente, el ácido algínico es un copolímero de bloques en el que una fracción de homopolímero de ácido D-manurónico (fracción MM), fracción de homopolímero de ácido L-glurónico (fracción GG) y fracción en la que el ácido D-manurónico y el ácido L-glurónico están dispuestos al azar (fracción MG) están ligadas arbitrariamente. La relación de material compuesto de ácido D-manurónico con respecto al ácido L-glurónico del ácido algínico (relación M/G) varía principalmente según el tipo de alga u otro organismo que sirve de origen de la misma, está afectada por el hábitat y estación de ese organismo, y se extiende durante un amplio intervalo de un tipo de alto G que tiene una relación M/G de aproximadamente 0,4 a un tipo de alto M que tiene una relación M/G de aproximadamente 5.

Una sal metálica monovalente de ácido algínico es un polisacárido, y aunque es difícil de determinar con exactitud el peso molecular, generalmente tiene un peso molecular ponderado medio de 10.000 a 10.000.000 y preferentemente 50.000 a 3.000.000. El alginato de sodio que tiene un peso molecular ponderado medio de aproximadamente 1.000.000 y 1.700.000 como se ha determinado por cromatografía de filtración en gel demostró efectos inhibidores del cambio degenerativo cartílago, efectos protectores del cartílago, efectos de reparación del cartílago y efectos inhibidores del dolor de las articulaciones superiores en comparación con el alginato de sodio que tiene un peso molecular de aproximadamente 400.000. En el caso de calcular el peso molecular de un polisacárido por cromatografía de filtración en gel, aquí normalmente están las posibilidades del error de medición del 10 al 20 %. Por ejemplo, un peso molecular de 400.000 puede fluctuar dentro del intervalo de 320.000 a 480.000, un peso molecular de 500.000 puede fluctuar dentro del intervalo de 400.000 a 600.000, y un peso molecular de 1.000.000 puede fluctuar dentro del intervalo de 800.000 a 1.200.000. Así, el intervalo de peso molecular ponderado medio preferible de una sal metálica monovalente de ácido algínico para el que los efectos sobre la enfermedad de las articulaciones son particularmente superiores es al menos 500.000 o más, más preferentemente 650.000 o más, e incluso más preferentemente 800.000 o más. Además de ser difícil la producción, ya que se producen problemas tales como la viscosidad cuando se prepara una soluciones acuosa que es excesivamente alta o solubilidad decreciente si el peso molecular es excesivamente alto, el peso molecular ponderado medio es preferentemente 5.000.000 o menos, y más preferentemente 3.000.000 o menos.

Como las sustancias de alto peso molecular derivadas de un origen natural normalmente no tienen un único peso molecular, sino que consisten en un agregado de moléculas que tienen diversos pesos moleculares, el peso molecular se mide en forma de una distribución del peso molecular que tiene un cierto intervalo. Una técnica de medición típica es cromatografía de filtración en gel. Ejemplos de información típica obtenida de la distribución del peso molecular como se ha determinado por cromatografía de filtración en gel incluyen peso molecular ponderado medio (Mw), peso molecular numérico medio (Mn) y relación de la varianza (Mw/Mn).

El peso molecular ponderado medio enfatiza la contribución del peso molecular promedio de polímeros que tienen un mayor peso molecular, y se representa con la siguiente fórmula:

$$Mw = \Sigma(WiMi)/W = \Sigma(HiMi)/\Sigma(Hi)$$

El peso molecular numérico medio se calcula dividiendo el peso total de polímeros entre el número total de polímeros.

$$Mn = W/\Sigma Ni = \Sigma(MiNi)/\Sigma Ni = \Sigma(Hi)/\Sigma(Hi/Mi)$$

Aquí, W representa el peso total de todos los polímeros, Wi representa el peso del i-ésimo polímero, Mi representa el peso molecular a un tiempo de elución i-ésimo, Ni representa el número de pesos moleculares Mi y Hi representa la altura al tiempo de elución i-ésimo.

Como los efectos de la regeneración de cartílago (y particularmente efectos de la regeneración de cartílago hialino) en lesiones por daño al cartílago, efectos de reparación del cartílago, efectos que inhiben cambios degenerativos del cartílago y/o efectos protectores del cartílago en el tratamiento de una enfermedad de las articulaciones se consideran que están ampliamente contribuidos por especies moleculares que tienen grandes pesos moleculares, puede usarse el peso molecular ponderado medio como indicador del peso molecular.

Se sabe que se producen diferencias en valores según el procedimiento de medición en la medición de pesos moleculares de sustancias de alto peso molecular derivadas de un origen natural (ejemplo de ácido hialurónico: Chikako Yomota y col., Bull. Natl. Health Sci., vol. 117, pág. 135-139 (1999), Chikako Yomota y col., Bull. Natl. Health Sci., vol. 121, pág. 30-33 (2003)). Los procedimientos para medir el peso molecular de alginato descritos en la bibliografía incluyen un procedimiento en el que el peso molecular se calcula a partir de la viscosidad intrínseca, y un procedimiento en el que peso molecular se calcula por cromatografía de exclusión por tamaño con detección de la dispersión de luz láser de ángulo múltiple (SEC-MALLS) (ASTM F2064-00 (2006), publicado por ASTM International). Además, también se describe en la bibliografía que en la medición del peso molecular por cromatografía de exclusión por tamaño (cromatografía de filtración en gel), el cálculo de una curva de calibración usando pululano para la sustancia patrón es insuficiente, y se recomienda que la medición del peso molecular se use en combinación con detector de la dispersión de luz láser de ángulo múltiple (MALLS) (concretamente, medición por SEC-MALLS). Además, también hay ejemplos del uso de pesos moleculares determinados por SEC-MALLS que se usan como especificaciones de catálogos de alginatos (FMC Biopolymer Inc., catálogo de alginatos de sodio PRONOVA™).

Los inventores de la presente invención encontraron que había diferencias en los efectos terapéuticos del alginato de sodio que tienen diferentes pesos moleculares en un modelo de OA, y midieron los pesos moleculares de estos alginatos por cromatografía de filtración en gel y SEC-MALLS. Como resultado, se determinó que los pesos moleculares determinados por cromatografía de filtración en gel demostraron una mayor correlación con la viscosidad y efectos terapéuticos de los alginatos. Concretamente, recientemente se encontró que en vez del procedimiento de SEC-MALLS generalmente recomendado, se encontró que el peso molecular determinado por cromatografía de filtración en gel era adecuado como parámetro para especificar el intervalo de peso molecular preferible de alginatos usados en una composición para tratamiento de una enfermedad de las articulaciones. Así, en el caso de especificar el peso molecular de un alginato en la presente memoria descriptiva, ese peso molecular es el peso molecular ponderado medio como se calcula por cromatografía de filtración en gel, a menos que se establezca específicamente de otro modo.

Las condiciones preferibles para cromatografía de filtración en gel se indican en los ejemplos. Una condición típica consiste en el uso de una curva de calibración usando pululano para la sustancia patrón. El pululano que tiene un peso molecular de al menos 1.600.000, 788.000, 404.000, 212.000 y 112.000 se usa preferentemente para el pululano usado para la sustancia patrón. Además, también pueden especificarse el eluato (soluciones de nitrato de sodio 200 mM), condiciones de columna y similares. Las condiciones de columna consisten preferentemente en usar carga basada en resina de polimetacrilato y usar al menos una columna que tiene un corte de peso molecular de 10.000.000 o más. Un ejemplo típico de una columna es TSKgel GMPWx1 (diámetro: 7,8 mm x 300 mm) (Tosoh Corp.).

Aunque una sal metálica monovalente de ácido algínico tiene un gran peso molecular y alta viscosidad cuando se aísla inicialmente de algas marrones, el peso molecular disminuye y la viscosidad se reduce durante el curso de someterse a secado por calor, liofilización, purificación y similares. Así, sales metálicas monovalentes de ácido algínico que tienen diferentes pesos moleculares pueden producirse controlando adecuadamente la temperatura en cada etapa de producción. Las sales metálicas monovalentes de ácido algínico que tienen un alto peso molecular se obtienen controlando la temperatura en cada una de las etapas de producción para que sea algo baja, mientras que las sales metálicas monovalentes de ácido algínico que tienen un bajo peso molecular se obtienen controlando la temperatura en cada etapa de producción para que sea algo alta. Además, también pueden producirse sales metálicas monovalentes de ácido algínico que tienen diferentes pesos moleculares por una técnica tal como seleccionando adecuadamente las algas marrones usadas para el material de partida, o fraccionando según peso molecular en el procedimiento de producción. Además, una sal metálica monovalente de ácido algínico que tiene un peso molecular diana también puede obtenerse mezclando una sal metálica monovalente de ácido algínico producida según diversos procedimientos de producción con un lote diferente de sal metálica monovalente de ácido algínico que tiene un peso molecular diferente o viscosidad después de haber medido el peso molecular o viscosidad del mismo.

Aunque el ácido algínico usado en la presente invención puede ser de un origen natural o sintético, se deriva preferentemente de un origen natural. Ejemplos de ácidos algínicos que se producen naturalmente incluyen aquellos extraídos de algas marrones. Aunque las algas marrones que contienen ácido algínico se encuentran prominentemente a lo largo de los litorales en todo el mundo, las algas que en realidad pueden usarse como materiales de partida de

ácido algínico están limitadas, incluyendo ejemplos típicos de las mismas especies de *Lessonia* encontradas en América del Sur, especies de *Macrocystis* encontradas en América del Norte, especies de *Laminaria* y *Ascophyllum* encontradas en Europa, y especies de *Durvillea* encontradas en Australia. Ejemplos de algas marrones que sirven de materiales de partida de ácido algínico incluyen especies de *Lessonia*, especies de *Macrocystis*, especies de *Laminaria*, especies de *Ascophyllum*, especies de *Durvillea*, especies de *Eisenia* y especies de *Ecklonia*.

3. Tratamiento de reducción de endotoxinas

La sal metálica monovalente de ácido algínico contenida en la composición para el tratamiento de una enfermedad de las articulaciones de la presente invención es una sal metálica monovalente de baja endotoxina de ácido algínico. Baja endotoxina se refiere a aquella en la que el nivel de endotoxinas de la misma se ha reducido sustancialmente a un grado que no induce inflamación o fiebre. Concretamente, la sal metálica monovalente de ácido algínico se ha sometido a tratamiento de reducción de endotoxinas. Se encontró sorprendentemente que sometiendo a este tratamiento de reducción de endotoxinas, además de poder potenciar la acción regenerativa de cartílago de la composición cuando se aplica a una lesión por daño al cartílago, la regeneración de hueso subcondral puede promoverse y puede potenciarse la resistencia mecánica del área afectada. Concretamente, usando ácido algínico de baja endotoxina en la composición de la presente invención, puede obtenerse una composición que tiene alta bioafinidad, y que no induce degeneración y respuestas inflamatorias en cartílago circundante.

El tratamiento de reducción de endotoxinas puede llevarse a cabo mediante un procedimiento conocido o un procedimiento que cumple el mismo. Por ejemplo, este tratamiento puede llevarse a cabo mediante el procedimiento de Suga y col. que implica la purificación de hialuronato de sodio (véase, por ejemplo, la solicitud de patente japonesa abierta a consulta por el público nº H9-324001), el procedimiento de Yoshida y col. que implica la purificación de β1,3-glucano (véase, por ejemplo, la solicitud de patente japonesa abierta a consulta por el público nº H8-269102), el procedimiento de William y col. que implica la purificación de un biopolímero tal como alginato o goma gellan (véase, por ejemplo, la traducción japonesa publicada nº 2002-530440 de la publicación internacional PCT), el procedimiento de James y col. que implica la purificación de polisacárido (véase, por ejemplo, el panfleto de la publicación internacional nº 93/13136), el procedimiento de Lewis y col. (véase, por ejemplo, la patente de EE.UU. nº 5589591), el procedimiento de Hermanfranck y col. que implica la purificación de alginato (véase, por ejemplo, Appl. Microbiol. Biotechnol. (1994), 40:638-643) o un procedimiento que cumple el mismo. El tratamiento de reducción de endotoxinas de la presente invención no está limitado a esto, pero puede llevarse a cabo mediante un procedimiento conocido tal como limpieza, purificación usando filtración con filtro (filtro de eliminación de endotoxinas o filtro de electrificación), ultrafiltración o una columna (tal como una columna de afinidad de adsorción de endotoxinas, filtración en columna de gel o columna de intercambio iónico), adsorción a una sustancia hidrófoba, resina o carbono activo y similares, tratamiento con disolvente orgánico (tal como extracción con un disolvente orgánico o precipitación o deposición mediante adición de disolvente orgánico), tratamiento con tensioactivo (véase, por ejemplo, la solicitud de patente japonesa abierta a consulta por el público nº 2005-036036) o una combinación adecuada de los mismos. Un procedimiento conocido tal como separación centrífuga puede combinarse adecuadamente con estas etapas de tratamiento. El tratamiento de reducción de endotoxinas se selecciona preferentemente adecuadamente según el tipo de ácido algínico.

El nivel de endotoxinas puede confirmarse mediante un procedimiento conocido, y puede medirse usando un procedimiento conocido tal como un procedimiento usando un reactivo de Limulus (LAL) o procedimiento usando un conjunto ES-24S Endospecy (marca registrada) (Seikagaku Corp.). Aunque no hay limitaciones particulares al procedimiento de tratamiento de endotoxinas del ácido algínico contenido en la composición de la presente invención, el contenido de endotoxinas de la sal metálica monovalente de ácido algínico en el caso de medir la endotoxina usando un reactivo de Limulus (LAL) es preferentemente 500 unidades de endotoxina (UE)/g o menos, más preferentemente 100 UE/g o menos, incluso más preferentemente 50 UE/g o menos, y particularmente preferentemente 30 UE/g o menos como resultado del mismo. El alginato de sodio que ha experimentado tratamiento de reducción de endotoxinas puede adquirirse como productos comercialmente disponibles tales como Sea Matrix (esterilizado) (Kimica Corp., Mochida International Ltd.) y Pronova™ UP LVG (FMC).

4. Preparación de soluciones de sal metálica monovalente de ácido algínico

La composición para tratar una enfermedad de las articulaciones de la presente invención puede prepararse usando una soluciones de una sal metálica monovalente de ácido algínico. La soluciones de una sal metálica monovalente de ácido algínico puede prepararse mediante un procedimiento conocido o procedimiento que cumple el mismo. Concretamente, la sal metálica monovalente de ácido algínico usada en la presente invención puede producirse mediante un procedimiento conocido tal como un procedimiento con ácido o procedimiento con calcio usando las algas marrones previamente descritas. Más específicamente, después de extraer de estas algas marrones usando una soluciones acuosa alcalina tal como soluciones acuosa de carbonato sódico, por ejemplo, el ácido algínico puede obtenerse añadiendo un ácido (tal como ácido clorhídrico o ácido sulfúrico), y puede obtenerse una sal de ácido algínico por intercambio iónico del ácido algínico. El tratamiento de reducción de endotoxinas se lleva entonces a cabo

como se describe previamente. No hay limitaciones particulares al disolvente de la sal de ácido algínico, siempre que sea un disolvente que puede aplicarse *in vivo*, y ejemplos de tales disolventes incluyen agua purificada, agua destilada, agua de intercambio iónico, agua Milli-Q, solución salina fisiológica y solución salina tamponada con fosfato (PBS). Éstos se esterilizan preferentemente y se someten preferentemente a tratamiento de reducción de endotoxinas. Por ejemplo, puede usarse agua Milli-Q después de esterilizar por filtración. Además, el procedimiento para obtener la composición de la presente invención se lleva a cabo preferentemente en un entorno que tiene bajos niveles de endotoxinas y bacterias. Por ejemplo, el procedimiento se lleva a cabo preferentemente en un banco limpio usando aparatos esterilizados, y los aparatos usados pueden tratarse con un agente de eliminación de endotoxinas comercialmente disponible.

En el caso de producir una composición como se ha descrito anteriormente usando una sal metálica monovalente de ácido algínico que ha sido purificada a un nivel de endotoxinas preferible, el contenido de endotoxinas de la composición es normalmente 500 UE/g o menos, más preferentemente 300 UE/g o menos, y particularmente preferentemente 150 UE/g o menos.

5. Viscosidad de la composición para tratar la artritis reumatoide

Aunque no hay limitaciones particulares a la viscosidad de la composición para tratar la enfermedad de las articulaciones de la presente invención, en el caso de inyectarla en una articulación, siempre que se obtengan efectos terapéuticos para la artritis reumatoide, es preferentemente 100 a 20000 mPa·s. Por ejemplo, la composición para tratar la enfermedad de las articulaciones de la presente invención puede ajustarse a una viscosidad adecuada usando el disolvente anteriormente mencionado. Si la viscosidad está dentro de este intervalo, la composición para tratar la enfermedad de las articulaciones de la presente invención puede inyectarse con una jeringuilla y similares. La viscosidad es preferentemente 150 a 15000 mPa·s, más preferentemente 200 a 10000 mPa·s, y particularmente preferentemente 250 a 6000 mPa·s. El uso de una viscosidad adecuada hace posible demostrar el efecto de compensación de la función de amortiguación del líquido sinovial, haciendo así posible demostrar el efecto de tratar artritis reumatoide en un estado al ser dispersado en líquido sinovial.

La viscosidad de la composición para tratar la enfermedad de las articulaciones puede ajustarse, por ejemplo, controlando la concentración de ácido algínico en la soluciones de una sal metálica monovalente de ácido algínico o controlando el peso molecular del ácido algínico.

La viscosidad de la soluciones de la sal metálica monovalente de ácido algínico aumenta cuando la concentración de ácido algínico en la soluciones es alta y disminuye cuando la concentración de ácido algínico en la soluciones es baja. Aunque es incapaz de establecerse inequívocamente como resultado de ser afectada por el peso molecular, la concentración preferible de ácido algínico en la soluciones del ión de metal monovalente de ácido algínico es aproximadamente 0,2 al 5 % en peso/volumen, más preferentemente 0,5 al 3 % en peso/volumen, y particularmente preferentemente 1 al 2,5 % en peso/volumen.

Una sal metálica monovalente de ácido algínico que tiene un alto peso molecular puede seleccionarse para obtener una composición que tiene alta viscosidad de una soluciones de una sal metálica monovalente de ácido algínico que tiene una baja concentración. Como la viscosidad de la soluciones de una sal metálica monovalente de ácido algínico está afectada por la relación M/G, puede seleccionarse adecuadamente un ácido algínico que tiene una relación M/G más preferible para la viscosidad de la soluciones y similares. La relación M/G de ácido algínico usada en la presente invención es aproximadamente 0,4 a 4,0, preferentemente aproximadamente 0,8 a 3,0 y más preferentemente aproximadamente 1,0 a 1,6.

Como se describe previamente, como la relación M/G se determina principalmente por el tipo de algas, el tipo de algas marrones usadas para el material de partida tiene un efecto sobre la viscosidad de la soluciones de la sal metálica monovalente de ácido algínico. El ácido algínico usado en la presente invención se deriva preferentemente de algas marrones de los géneros *Lessonia, Macrocystis, Laminaria, Ascophyllum* y *Durvillea*, más preferentemente se deriva de algas marrones de los géneros *Lessonia*, y particularmente preferentemente algas marrones de *Lessonia nigrescens*.

6. Formulación y aplicación de una composición para tratar la artritis reumatoide que contiene una sal metálica monovalente de ácido algínico

La composición para tratar la enfermedad de las articulaciones de la presente invención se usa inyectando en una articulación de un mamífero humano o no humano tal como una vaca, mono, ave, gato, ratón, rata, cobaya, hámster, cerdo, perro, conejo, oveja o caballo.

La forma de la composición para tratar la enfermedad de las articulaciones de la presente invención es un líquido fluido, concretamente una soluciones. En la presente invención, el término “que tiene fluidez” se refiere a tener una propiedad que hace que la forma de la misma cambie a una forma amorfa. Por ejemplo, la composición tiene preferentemente fluidez de forma que pueda inyectarse en un área afectada. La composición de la presente invención en forma de una

soluciones puede aplicarse fácilmente a una articulación con una jeringuilla, pipeta para gel o jeringuilla para un fin especial.

La composición para tratar la enfermedad de las articulaciones de la presente invención demuestra efectos terapéuticos sobre la artritis reumatoide, teniendo efectos de reparación del cartílago, efectos inhibidores de cambios degenerativos de cartílago, efectos protectores del cartílago, efectos inhibidores de la inflamación de tejido de la articulación, efectos inhibidores de dolor atribuible a inflamación de tejido de la articulación, efectos inhibidores de degeneración de tejido sinovial y/o efectos inhibidores de la destrucción osteocondral. La composición para tratar una enfermedad de las articulaciones de la presente invención inhibe la destrucción de la articulación y mejora función de la articulación mediante estos efectos combinados.

Un aspecto de la presente invención es una composición para tratar osteoartritis. En el caso de que un daño al cartílago se extienda sobre una amplia área de cartílago articular en el modo de osteoartritis, o si se desea tratar un tipo de daño al cartílago frecuentemente observado en un estadio comparativamente temprano de osteoartritis de forma que se altere la suavidad de la superficie del cartílago y hayan empezado cambios degenerativos aún cuando todavía no se hayan producido defectos de cartílago bien definidos, la composición de la presente invención se aplica preferentemente inyectando a una cavidad articular y permitiendo que se disperse por el líquido sinovial. El contacto de una sal metálica monovalente de ácido algínico con una lesión por daño al cartílago promueve la reparación de la articulación en la lesión por daño al cartílago, inhibe cambios degenerativos producidos por la inflamación y desgaste y protege al cartílago. Además, como resultado del principio activo en forma de una sal metálica monovalente de ácido algínico que se dispersa en todo el líquido sinovial, se inhiben respuestas inflamatorias de tejido circundante, que incluye tejido sinovial, y se demuestran efectos que suprimen dolor. Al mismo tiempo, la presencia de una sal metálica monovalente de ácido algínico dentro de líquido sinovial cumple la función de compensar la función de líquido sinovial, sirviendo de amortiguación y lubricante.

Otro aspecto de la composición para tratar una enfermedad de las articulaciones de la presente invención es una composición para suprimir el dolor de las articulaciones. El dolor de articulaciones es frecuentemente un problema en la artritis reumatoide. Un aspecto preferible de la presente invención es una composición para tratar el dolor de articulaciones asociado a la artritis reumatoide, y es particularmente preferentemente una composición para suprimir dolor de la articulación de la rodilla asociado a la artritis reumatoide crónica. Aunque el mecanismo de aparición de la artritis reumatoide todavía no se ha entendido completamente, se cree que el tejido sinovial y el tejido de cartílago son destruidos por citocinas inflamatorias resultantes de una respuesta autoinmunitaria. Como una sal metálica monovalente de ácido algínico demuestra efectos que inhiben respuestas inflamatorias de tejido circundante, que incluye tejido sinovial, y suprimen dolor, la composición de la presente invención puede inhibir respuestas inflamatorias y suprimir dolor asociado a las mismas administrando en una articulación que padece artritis reumatoide.

Un aspecto de la composición para tratar una enfermedad de las articulaciones de la presente invención es una composición para tratar la artritis reumatoide. La composición de la presente invención inhibe la destrucción osteocondral y degeneración de tejido sinovial que acompaña a una respuesta autoinmunitaria. Además, si la degeneración de tejido de la articulación se produce debido a una respuesta autoinmunitaria, la articulación ya no puede demostrar su movimiento suave inherente, produciendo así daño mecánico al cartílago del mismo modo que la osteoartritis. La composición de la presente invención promueve la reparación de la articulación de daños al cartílago y protege al cartílago e inhibe cambios degenerativos en el cartílago producidos por inflamación y desgaste. La composición de la presente invención demuestra efectos terapéuticos que inhiben la destrucción de la articulación en la artritis reumatoide mediante estos efectos combinados.

Otro aspecto de la composición para tratar una enfermedad de las articulaciones de la presente invención es una composición para aliviar, mejorar y/o curar diversos síntomas asociados a la artritis reumatoide. En una enfermedad de las articulaciones, el cartílago, tejido de cartílago y/o tejido de la articulación (tal como membrana sinovial, cápsula articular o hueso subcondral) son dañados por irritación mecánica o respuesta inflamatoria, y se producen síntomas compuestos tales como desgaste del cartílago articular, cambios degenerativos en tejido de cartílago debido a irritación mecánica junto con respuestas inflamatorias, inflamación de la membrana sinovial y otro tejido de la articulación, dolor de las articulaciones atribuible a inflamación, degeneración de tejido sinovial y destrucción osteocondral. Como la composición de la presente invención contiene como principio activo de la misma una sal metálica monovalente de baja endotoxina de ácido algínico, tiene múltiples efectos de proteger el cartílago de la irritación mecánica, inhibiendo cambios degenerativos en el cartílago producidos por desgaste e inflamación, reparando lesiones por daño al cartílago, inhibiendo inflamación de tejido de la articulación y dolor, inhibiendo degeneración de tejido sinovial e inhibiendo la destrucción osteocondral. Como resultado, la composición de la presente invención puede inhibir el progreso de una enfermedad de las articulaciones, y aliviar, mejorar y/o curar síntomas. Además, la composición para tratar la enfermedad de las articulaciones de la presente invención tiene el efecto de mejorar la función de la articulación mediante el alivio, mejora y/o cura de síntomas de la misma. La mejora de la función de la articulación se refiere a mejorar la amplitud de movimiento de la articulación, mejorando el movimiento llevado a cabo durante el curso de la vida cotidiana y similares.

En el caso de aplicar la composición para tratar la enfermedad de las articulaciones de la presente invención inyectando en una articulación, la dosis se determina adecuadamente según la cantidad de líquido sinovial de la articulación en la que la composición va a inyectarse, y aunque no hay limitaciones particulares a la misma, en el caso de administrar a una articulación de la rodilla o articulación del hombro humana, la dosis es normalmente 1 a 5 ml y más preferentemente 2 a 3 ml. Además, el procedimiento de administración puede consistir en, por ejemplo, administrar en cinco administraciones consecutivas a intervalos de una semana, seguido de administraciones continuas cada 2 a 4 semanas. Aunque no hay limitaciones particulares a la dosis, la dosis puede ajustarse adecuadamente según los síntomas y efectos. Por ejemplo, puede adoptarse un procedimiento de administración en el que la administración se continúa adecuadamente una vez cada dos semanas, una vez cada mes, una vez cada dos meses, una vez cada tres meses o una vez cada seis meses. Como el ácido algínico no está inherentemente presente en el cuerpo, los animales no tienen una enzima que pueda romper específicamente el ácido algínico. Aunque el ácido algínico se descompone normalmente gradualmente mediante hidrólisis en un cuerpo animal, como su descomposición en el cuerpo es lenta en comparación con polímeros tales como el ácido hialurónico, puede esperarse que sostenga efectos a largo plazo en el caso de administrarse en una articulación.

La composición para tratar la enfermedad de las articulaciones de la presente invención contiene como principio activo de la misma una sal metálica monovalente de baja endotoxina de ácido algínico. Los inventores de la presente invención encontraron por primera vez que el propio ácido algínico demuestra efectos terapéuticos sobre tejido de cartílago y tejido de la articulación en el caso de administrar ácido algínico en una articulación del cuerpo. Una sal metálica monovalente de ácido algínico se refiere preferentemente a alginato de sodio, y más preferentemente a alginato de sodio que tiene un peso molecular ponderado medio de 500.000 o más como se ha determinado por cromatografía de filtración en gel. El contener ácido algínico como principio activo significa que el ácido algínico está contenido en una cantidad que permite que demuestre efectos terapéuticos sobre tejido de cartílago y tejido de la articulación cuando se aplica a un área afectada, y esa cantidad es preferentemente al menos el 0,1 % en peso/volumen o más de la composición entera, más preferentemente el 0,5 % en peso/volumen o más, y particularmente preferentemente del 1 al 3 % en peso/volumen.

La composición para regenerar cartílago o tratar una enfermedad de cartílago de la presente invención también puede contener otros principios farmacéuticamente activos y componentes generalmente usados en productos farmacéuticos, tales como estabilizadores, emulsionantes, ajustadores de la presión osmótica, tampones, agentes isotónicos, conservantes, aliviadores del dolor o colorantes comúnmente usados según sea necesario.

Además, en un aspecto de la presente invención, la composición de la presente invención no contiene un componente que demuestre acción farmacológica sobre el cartílago o tejido de la articulación distinto de una sal metálica monovalente de baja endotoxina de ácido algínico. Una composición que contiene como principio activo de la misma solo una sal metálica monovalente de baja endotoxina de ácido algínico también puede demostrar efectos adecuados para tratar una enfermedad de las articulaciones.

Por ejemplo, es preferible usar una composición que no contenga células para facilitar el procedimiento quirúrgico, además de reducir el riesgo de infección por virus y similares atribuible al cuerpo o el procedimiento de cultivo sin poner una excesiva carga sobre el cuerpo mediante procedimientos tales como recoger condrocitos, periostio o médula ósea. Células se refiere específicamente a células para regenerar tejido de cartílago, ejemplos de las cuales incluyen citoblastos mesenquimatosos de la médula ósea, células del estroma mesenquimatosas de la médula ósea, células precursoras de cartílago, condrocitos, sinoviocitos, citoblastos eritropoyéticos y células ES. La composición para tratar una enfermedad de las articulaciones de la presente invención es una composición que tiene un principio activo de la misma, una sal metálica monovalente de baja endotoxina de ácido algínico, y se basa en el hallazgo de que el propio ácido algínico tiene efectos terapéuticos sobre la enfermedad de las articulaciones. Un ejemplo preferible de una composición terapéutica es una composición libre de células para tratar una enfermedad de las articulaciones inyectada en una articulación que contiene como principio activo de la misma alginato de sodio de baja endotoxina que tiene un peso molecular ponderado medio de 500.000 o más como se ha determinado por cromatografía de filtración en gel, que puede demostrar efectos terapéuticos superiores a los de las preparaciones de ácido hialurónico usadas en la técnica anterior.

La composición para tratar la enfermedad de las articulaciones de la presente invención no contiene un agente de curado para la sal metálica monovalente de ácido algínico. Un agente de curado para una sal metálica monovalente de ácido algínico se refiere a un componente que produce el curado o la gelificación de ácido algínico en presencia de una sal metálica monovalente de ácido algínico en soluciones, ejemplos de los cuales incluyen compuestos de iones metálicos divalentes o más tales como Ca^{2+}, Mg^{2+}, Ba^{2+} o Sr^{2+}, y reactivos de reticulación que tienen 2 a 4 grupos amino en una molécula del mismo. Ejemplos específicos incluyen $CaCl_2$, $MgCl_2$, $CaSO_4$ y $BaCl_2$, gluconato de calcio y alginato de calcio. Si estos componentes están contenidos a un grado que produzca el curado y/o gelificación de ácido algínico, la inyección con una jeringuilla y similares se dificulta debido a la gelificación del ácido algínico. Como resultado, se producen problemas tales como la obstrucción de la función de la articulación debido a la solidificación de una gran cantidad de ácido algínico dentro de una articulación. Una composición curable es adecuada para usarla

cargándola en un orificio, etc., de un defecto de la articulación. Por otra parte, con el fin de demostrar efectos terapéuticos combinados en todo el tejido de la articulación de la artritis reumatoide que se extienden por toda la articulación como en el modo de la composición de la presente invención, la propia composición no es curable. Aunque disolventes de fármacos típicos contienen cantidades traza de iones metálicos divalentes, los agentes de curado como se refieren aquí no son aplicables en tanto que se añadan con la intención de curar y/o gelificar una sal metálica monovalente de ácido algínico. Un aspecto de la composición de la presente invención es una composición que no contiene un agente de curado de una sal metálica monovalente de ácido algínico a un grado que produzca el curado y/o gelificación de ácido algínico. En otras palabras, un aspecto de la composición de la presente invención es una composición no curable.

Además, la presente invención proporciona un procedimiento para tratar enfermedad de las articulaciones usando la composición para tratar la enfermedad de las articulaciones de la presente invención como se ha descrito anteriormente. El procedimiento para tratar enfermedad de las articulaciones de la presente invención inhibe el progreso de la enfermedad de las articulaciones y alivia, mejora y/o cura síntomas administrando la composición para tratar una enfermedad de las articulaciones de la presente invención en una articulación. La administración de la composición para tratar una enfermedad de las articulaciones de la presente invención en una articulación inhibe el progreso de la enfermedad de las articulaciones y alivia, mejora y/o cura síntomas demostrando al menos uno de los efectos seleccionados del grupo que consiste en inhibición de cambios degenerativos de cartílago, protección del cartílago, reparación del cartílago, supresión del dolor de las articulaciones, inhibición de la inflamación de las articulaciones, inhibición de la degeneración de tejido sinovial e inhibición de la destrucción osteocondral. La función de la articulación mejora y la destrucción de la articulación se inhibe mediante estos efectos combinados.

No hay limitaciones particulares al procedimiento para aplicar la composición para tratar una enfermedad de las articulaciones de la presente invención a una articulación, y, por ejemplo, la composición puede inyectarse directamente en una articulación con una jeringuilla, pipeta para gel o jeringuilla para un fin especial. En el caso de aplicar inyectando en una articulación, preferentemente se usa una aguja de 18 a 27G. “Inyectar en una articulación” se refiere a inyectar una composición líquida que tiene fluidez en una cavidad articular, bolsa o vaina del tendón y similares. En el caso de uso para tratar artritis reumatoide, la composición se aplica preferentemente inyectando en una cavidad articular. Además, aunque puede producirse artritis reumatoide en diversas articulaciones tales como articulaciones de la rodilla, hombro, cadera, espalda baja, tobillo, muñeca o dedos, la composición de la presente invención puede aplicarse a cualquiera de estas articulaciones.

Además, también pueden administrarse fármacos concomitantes que incluyen antibióticos tales como estreptomicina, penicilina, tobramicina, amikacina, gentamicina, neomicina o anfotericina B, o fármacos antiinflamatorios tales como aspirina, fármacos antiinflamatorios no esteroideos (AINE) o acetaminofeno, o fármacos esteroideos, antes, simultánea a o después de la administración de la composición de la presente invención. Estos fármacos también pueden usarse mezclando en la composición de la presente invención.

7. Kit para tratar la enfermedad de las articulaciones

Además, la presente invención proporciona un kit para tratar una enfermedad de las articulaciones. Este kit puede incluir la composición para tratar la enfermedad de las articulaciones de la presente invención como se ha descrito anteriormente, jeringuilla, pipeta para gel, carga para un fin especial, instrucciones y similares. Un ejemplo específico preferible de un kit es en el que una sal metálica monovalente de ácido algínico se cierra herméticamente en un compartimento de una jeringuilla compuesta por dos compartimentos íntegramente formados divididos por una división, y una soluciones que contiene solución salina fisiológica como soluciones disolvente se cierra herméticamente en el otro compartimento, y está compuesta de forma que la división entre los compartimentos pueda penetrarse fácilmente en el momento de uso para permitir mezclar y disolver el contenido de ambos compartimentos que van a usarse en el momento de uso. Otro ejemplo de un kit es aquel en el que una soluciones de sal metálica monovalente de ácido algínico se cierra herméticamente en una jeringuilla precargada que permite administrarse directamente en el momento de uso sin requerir un procedimiento de preparación. Además, el kit también puede contener fármacos concomitantes que incluyen antibióticos tales como estreptomicina, penicilina, tobramicina, amikacina, gentamicina, neomicina o anfotericina B, o fármacos antiinflamatorios tales como aspirina, fármacos analgésicos antipiréticos no esteroideos (AINE) o acetaminofeno, o fármacos esteroides.

El uso de este kit permite llevar a cabo suavemente la terapia de la enfermedad de las articulaciones.

Además, la presente memoria descriptiva cita la solicitud de patente japonesa nº 2007-277005, además de la solicitud de patente internacional PCT/JP2008/52999.

Aunque lo siguiente proporciona una explicación detallada de la presente invención mediante ejemplos de la misma, la presente invención no se limita a estos ejemplos.

Ejemplo 1

Modelo de reparación de cartílago de conejo

(1) Producción de células de trasplante

Se aislaron y cultivaron células del estroma mesenquimatoso de la médula ósea (BMSC) para obtener células de trasplante. Las BMSC incluyen células eritropoyéticas y similares, además de citoblastos mesenquimatosos de la médula ósea. Se recogieron 10 ml de médula ósea de la tibia de conejos blancos japoneses de cuatro meses, seguido de lavar dos veces con PBS libre de Ca-Mg (Gibco BRL Lab.) y suspensión en DMEM-alta glucosa (DMED-HG, Sigma Chemical, St. Louis, MO). Se eliminaron los coágulos de sangre con un filtro de células que tenía un diámetro de poro de 70 µm (Falcon Co., Ltd.). Las células se incubaron entonces mientras que se humidificaban a 37 ºC y 5 % de CO_2 en una placa de cultivo de 100 mm que contenía un medio de cultivo que consistió en DMEM-HG, 10 % de suero bovino fetal (SBF, Gibco, Life Technology, Grand Island, NY) y 1 % de antibióticos (penicilina-estreptomicina-Fungizone 100X concentrado, Cambrex Biosciences, Walkersville, MD). El medio de cultivo se sustituyó cada tres días y se eliminaron las células no adherentes. Después de cultivar la monocapa de las células adherentes durante 10 a 14 días, las células se eliminaron con tripsina-EDTA (10 mM, Sigma, RU) y se contaron, seguido de subcultivo cada tres días.

(2) Procedimiento

(Procedimiento)

Cuarenta conejos blancos japoneses hembra (pesos corporales: 2,6 a 2,9 kg) se anestesiaron con isoflurano en gas O_2 e inyección intravenosa de pentobarbital (0,05 mg/kg), seguido de inyección intramuscular de antibiótico (penicilina G, Meiji-Seika, Japón) y se les afeitó las patas. Se hizo una incisión anteromedial de 2 cm en la piel y se accedió a la ranura troclear usando un abordaje pararrotuliano medial. Se crearon defectos osteocondrales (diámetro: 5 mm, profundidad: 2 mm) en la troclea femoral usando un taladro eléctrico (Rexon, Japón). Las rodillas se irrigaron entonces con solución salina fisiológica, se confirmó la ausencia de hemorragia en los defectos y los defectos se dejaron secar.

En el presente ejemplo, el experimento se realizó dividiendo los animales en cinco grupos.

A) Grupo de control (vacío)

B) Grupo de alginato de calidad alimentaria (sin células)

C) Grupo de alginato de calidad alimentaria + células (2,5 x 10^7/ml)

D) Grupo de alginato purificado (sin células)

E) Grupo de alginato purificado + células (2,5 x 10^7/ml)

Los defectos se dejaron sin tratar en el grupo de control A). Además, la soluciones al 2 % en peso/volumen de alginato de sodio de calidad alimentaria se aplicó a los defectos en el grupo de alginato de calidad alimentaria B) (sin células). Se aplicó soluciones al 2 % en peso/volumen de alginato de sodio purificado a los defectos en el grupo D) de alginato purificado (sin células). El alginato de sodio 500 (nº de serie 199-09961) fabricado por Wako Pure Chemical Industries, Ltd. se usó para el alginato de calidad alimentaria, mientras que Sea Matrix (esterilizado) (nº de serie B5Y01) fabricado por Kimica Corp., Mochida International Ltd. se usó para el alginato purificado. Además, las células obtenidas en (1) se suspendieron en soluciones al 2 % en peso/volumen de alginato de sodio de calidad alimentaria o soluciones al 2 % en peso/volumen de alginato de sodio purificado y se aplicaron a los defectos de cartílago articular en el grupo C) de alginato de calidad alimentaria + células y el grupo E) de alginato purificado + células, respectivamente. Cuando los niveles de endotoxinas se midieron usando un kit de ensayo LAL comercialmente disponible (Limulus Color KY Test Wako, Wako, Japón), el nivel de endotoxinas del alginato de sodio purificado fue 5,76 UE (unidades de endotoxina)/g y el del alginato de sodio de calidad alimentaria fue 75950 UE/g, indicando así que el nivel de endotoxinas del alginato de sodio purificado fue mucho menor que el del alginato de sodio de calidad alimentaria. Concretamente, el alginato de sodio purificado se había sometido a tratamiento de reducción de endotoxinas. Además, el contenido de metales pesados del alginato de sodio purificado fue 20 ppm o menos, el contenido de sulfato de plomo fue del 0,98 % o menos, y el contenido de arsénico fue 2 ppm o menos.

El motivo para hacer la concentración de las soluciones de alginato de sodio al 2 % en peso/volumen fue que ésta permite ajustar la viscosidad a un nivel de 5000 a 6000 mPa·s adecuado para el procedimiento. Los conejos se inmovilizaron con los defectos hacia arriba, y cada composición se aplicó a los defectos usando una pipeta para gel.

Como la viscosidad de la soluciones de alginato de sodio fue adecuada en los grupos B) a E), las soluciones de alginato de sodio no se salieron de los defectos a pesar de condiciones que facilitaban el flujo debido al líquido sinovial. Posteriormente, aproximadamente 0,5 ml de soluciones 100 mM de $CaCl_2$ se aplicaron lentamente y continuamente

durante el transcurso de 10 segundos a la superficie del injerto usando una jeringuilla 27G. La capa superficial del injerto gelificó inmediatamente y las células no dejaron el área afectada. La soluciones de $CaCl_2$ se lavó con solución salina fisiológica. No se requirió posterior inmovilización y el área afectada se suturó tras el procedimiento. Los conejos pudieron moverse libremente.

Los conejos objeto se sacrificaron mediante inyección intravenosa de una dosis excesiva de pentobarbital a las 4 semanas o 12 semanas después del procedimiento. Los extremos distales de los fémures se cortaron con una sierra eléctrica.

(Observaciones globales)

Se observó el aspecto global macroscópicamente y se puntuó. El aspecto global se puntuó según los criterios de la FIG. 1 con referencia al procedimiento de Gabriele, G. y col. (Biomaterial, 21 (2000), 2561-2574).

(Tinción)

Posteriormente, los especímenes se fijaron con paraformaldehído, se descalcificaron y se incorporaron en parafina. Las secciones localizadas 5 µm del centro del defecto se tiñeron con safranina O, tinción de H-E y se inmunotiñeron con anti-colágeno tipo I y anti-colágeno tipo II. El sistema de puntuación descrito en la FIG. 2 se usó para evaluar el tejido cartilaginoso recientemente formado y el tejido se evaluó microscópicamente. Observadores ciegos independientes realizaron la puntuación.

(Medición de la resistencia mecánica)

La resistencia mecánica del área afectada se midió usando una prueba de indentación. Los especímenes se fijaron firmemente con la articulación femororrotuliana hacia arriba, y la prueba se llevó a cabo a temperatura ambiente. El indentador se movió automáticamente hacia el centro del cartílago regenerado y se registró el desplazamiento (mm) con respecto a la carga (N). El espesor del tejido regenerado se midió de secciones histológicas. Entonces se obtuvo el módulo de Young a partir de la región lineal de las curvas de carga-desplazamiento.

(3) Resultados

Los resultados de la tinción se muestran en la FIG. 3 a FIG. 6.

Como resultado de la tinción con H-E, la tinción con safranina O y la inmunotinción anti-colágeno tipo II, la formación más prominente de cartílago hialino y colágeno tipo II en comparación con los otros grupos se confirmó en el grupo E) de alginato purificado + células (FIG. 6) en una etapa temprana 4 semanas después del procedimiento. Se observó que aproximadamente el 80 % del cartílago se regeneraba a las 12 semanas después del procedimiento. La formación de hueso subcondral fue extremadamente favorable basándose en los resultados de tinción con H-E. La tinción con safranina O reveló formación de proteoglucano, y también pudo confirmarse la formación de una matriz extracelular. Por otra parte, difícilmente se observó cualquier formación de cartílago fibroso basándose en los resultados de tinción con H-E e inmunotinción anti-colágeno tipo I.

El grupo D) de alginato purificado (sin células) (FIG. 5) demostró formación favorable de cartílago hialino, colágeno tipo II y hueso subcondral en comparación con el grupo C) de alginato de calidad alimentaria + células (FIG. 4). En el grupo D), en el que las células no se incorporaron, se encontró sorprendentemente que la regeneración de cartílago se había obtenido por condrocitos hialinos. Además, también se encontró inesperadamente que el grupo D) en el que no se incorporaron células demostró una capacidad superior para regenerar daño al cartílago en comparación con el grupo C) en el que se incorporaron células.

Por otra parte, difícilmente hubo neogénesis del cartílago y se observó colágeno tipo II en el grupo de control A) (FIG. 3) en el que los defectos se dejaron sin tratar.

Los resultados de evaluación obtenidos puntuando macroscópicamente el aspecto global (Macro) y los resultados de evaluación obtenidos puntuando observaciones basadas en la tinción descrita anteriormente (Histológicas) se muestran en la FIG. 7.

Las puntuaciones totales obtenidas combinando las puntuaciones Macro e Histológicas en la semana 12 consistieron en 22,71 para el grupo E) de alginato purificado + células, 19,57 para el grupo D) de alginato purificado (sin células), 14,75 para el grupo C) de alginato de calidad alimentaria + células, 10,25 para el grupo B) de alginato de calidad alimentaria (sin células) y 8,43 para el grupo de control A) (vacío). Así, el grupo E) de alginato purificado + células demostró la mayor puntuación, seguido del grupo D) de alginato purificado (sin células) y el grupo C) de alginato de calidad alimentaria + células en ese orden. Fue completamente inesperado que el grupo D) en el que no se incorporaron células diera una mayor puntuación total, y demostrando así superior capacidad para regenerar cartílago en daños al cartílago, en comparación con el grupo C) en el que se incorporaron células.

Los resultados de puntuación para tanto la evaluación macroscópica del aspecto global (Macro total) como la evaluación por tinción (Histológica total) fueron los mayores en el grupo E) de alginato purificado + células del mismo modo que se ha descrito anteriormente, y la siguiente puntuación mayor se observó en el grupo D) de alginato purificado (sin células).

Mirando los parámetros de evaluación Macro, los grupos D) y E), en los que se usó alginato purificado, fueron superiores para todos los parámetros de la integración del borde (tejido nuevo con respecto a cartílago nativo), suavidad de la superficie del cartílago, superficie del cartílago, grado de llenado y color del cartílago, opacidad o translucidez del neocartílago en comparación con los grupos B) y C) en los que se usó alginato de calidad alimentaria.

Mirando los parámetros de evaluación Histológica, los grupos D) y E), en los que se usó alginato purificado, demostraron mayores puntuaciones que los grupos B) y C), en los que se usó alginato de calidad alimentaria, para los parámetros de naturaleza del tejido predominante, regularidad superficial, integridad estructural y homogeneidad, espesor, unión a cartílago adyacente, cambios degenerativos en cartílago adyacente y respuesta inflamatoria.

Basándose en estos hallazgos, los grupos D) y E) demostraron formación extremadamente favorable de condrocitos y tejido de cartílago en un daño al cartílago, que incluye formación de cartílago hialino, colágeno tipo II y hueso subcondral. Se observó difícilmente cualquier formación de cartílago fibroso.

La unión del tejido regenerado a tejido huésped usando alginato purificado también fue favorable, hubo poca degeneración o inflamación en cartílago adyacente, y se determinó que la bioafinidad era alta.

Los resultados de medición de la resistencia mecánica para los grupos D) y E) de alginato purificado se muestran en la FIG. 8.

Como resultado de medir la resistencia mecánica para los grupos de alginato purificado, la resistencia mecánica en el grupo E) de alginato purificado + células fue un módulo de Young de 8 frente a un módulo de Young de 10 en tejido de cartílago normal, indicando así que la fuerza se había recuperado a casi un estado normal libre de daño. Este hallazgo también respaldó la reivindicación de que la composición de la presente invención incorporada con células tiene resistencia mecánica superior, y es favorable con respecto a la regeneración de cartílago hialino fuerte y formación de hueso subcondral.

Ejemplo 2

<u>Medición de la distribución de peso molecular de alginato de sodio purificado</u>

<u>(1) Procedimiento</u>

La distribución de peso molecular de alginato de sodio purificado se midió por cromatografía de filtración en gel en las condiciones indicadas a continuación.

Columna: TSKgel GMPWx1, 2 columnas + TSKgel G2500PWx1, 1 columna (Tosoh Corp.) (diámetro 7,8 mm x 300 mm x 3 columnas)

Temperatura de las columnas: 40 ºC

Eluato: soluciones acuosa 200 mM de nitrato de sodio

Concentración de muestra: 0,05 %

Velocidad de flujo: 1,0 ml/min

Volumen de inyección: 200 µl

Detector: RI (refractómetro diferencial)

Patrones: Pululano, glucosa (pesos moleculares: 1.600.000, 788.000, 404.000, 212.000, 112.000, 47.300, 22.800, 11.800, 5900, 180)

(2) Resultados

(Tabla 1)

Muestra de medición	Peso molecular numérico medio Mn	Peso molecular ponderado medio Mw	Relación de la varianza Mw/Mn	(Referencia) Viscosidad de soluciones acuosa al 1 %
Alginato de sodio purificado (Kimica Corp., Mochida International Ltd., Sea Matrix™ (esterilizado), nº de serie B5Y01)	430.000	1.700.000	4,0	400 a 500 mPa·s
Alginato de sodio purificado (FMC Biopolymer AS, Pronova™ SLG20)	66.000	440.000	6,6	20 a 100 mPa·s

(3) Discusión

El peso molecular ponderado medio del alginato de sodio purificado usado en el modelo de reparación de cartílago de conejo del Ejemplo 1 fue 1.700.000 como se mide usando el procedimiento descrito anteriormente. Como se indica en el Ejemplo 1, el alginato de sodio demostró efectos regenerativos de cartílago hialino en el modelo de reparación de cartílago de conejo tanto con como sin células. Por otra parte, aunque se realizó un experimento similar usando ácido algínico de baja endotoxina (Pronova™ LVG, actualmente Pronova™ UP LVG, FMC Biopolymer Inc.) como se describe en la Referencia 3, se desvela que el cartílago fibroso se forma en el caso de aplicar solo ácido algínico que no contiene células a un defecto de cartílago. Además, la versión esterilizada de Pronova™ LVG se designa Pronova™ SLG20, el peso molecular ponderado medio del mismo como se ha determinado por el procedimiento descrito anteriormente fue 440.000. Aunque Sea Matrix™ y Pronova™ tienen una característica común de ser ácidos algínicos de baja endotoxina, sus ácidos algínicos se diferencian en términos de peso molecular, y se cree que esta diferencia conduce a diferencias en los efectos regenerativos de cartílago. Aunque la viscosidad puede ajustarse por la concentración de ácido algínico, en un experimento en el que se incorporaron diferentes concentraciones de geles de ácido algínico (0,5 al 4 %) con condrocitos, se trasplantaron debajo de la piel de ratones y se confirmaron para la generación de cartílago, se informó que la concentración de ácido algínico no tenía un efecto sobre los efectos de generación de cartílago (Keith T. Paige y col., “De Novo Cartilage Generation Using Calcium Alginate-Chondrocyte Constructs”, Plastic and Reconstructive Surgery, vol. 97: 1996, pág. 168-178). Así, se cree que la diferencia en los efectos regenerativos de cartílago entre Sea Matrix™ y Pronova™ es atribuible al peso molecular. Concretamente, aunque el uso de ácido algínico de baja endotoxina permite la obtención de una composición que tiene alta bioafinidad con bajos niveles de degeneración y respuestas inflamatorias en cartílago circundante, usando también ácido algínico que tiene un alto peso molecular, se encontró que puede obtenerse una composición para regenerar cartílago o composición terapéutica que tiene efectos regenerativos de cartílago extremadamente superiores que permiten la regeneración de cartílago incluso sin incorporar células en su interior. El ácido algínico de baja endotoxina que tiene un peso molecular ponderado medio de al menos 500.000 o más, y preferentemente 650.000 o más, es útil para la regeneración de cartílago, y se encontró que tener un peso molecular ponderado medio de 1.000.000 a 2.000.000 era más preferible, y se encontró que tener un peso molecular ponderado medio de aproximadamente 1.500.000 a 2.000.000 era particularmente preferible.

Ejemplo 3

Modelo de osteoartritis de conejo (modelo de resección de ligamento cruzado anterior (LCA))

(1) Procedimiento

Se creó un modelo de OA en ambas articulaciones de la rodilla de conejos blancos japoneses hembra (pesos corporales: 2,6 a 2,9 kg) según el procedimiento de Vignon, E. y col. (Vignon, E., Bejui, J., Mathieu, P., Hartmann, JD, Ville, G., Evreux, JC, y col., Histological cartilage changes in a rabbit model of osteoarthritis, J. Rheumatol., 1987:14 (Spec No): 104-6). Se asignaron tres animales cada uno (6 rodillas) a los cuatro siguientes grupos.

A) Grupo de control (solución salina fisiológica)

B) Grupo de dosis de soluciones al 1 % de hialuronato de sodio (peso molecular: aprox. 900.000, viscosidad: aprox. 2300 mPa·s)

C) Grupo de dosis de soluciones al 1 % de alginato de sodio purificado (peso molecular: aprox. 1.700.000,

viscosidad: aprox. 500 mPa·s)

D) Grupo de dosis de soluciones al 2 % de alginato de sodio purificado (peso molecular: aprox. 1.700.000, viscosidad: aprox. 5000 mPa·s)

La soluciones de B) a D) se prepararon usando solución salina fisiológica. El alginato de sodio purificado de C) y D) fue el mismo que el alginato de sodio purificado usado en el Ejemplo 1 (Kimica Corp., Mochida International Ltd., Sea Matrix (esterilizado), nº de serie B5Y01).

Tras la resección del ligamento cruzado anterior, cada una de las soluciones A) a D) anteriores se administraron a la cavidad articular en las semanas 4, 5, 6, 7 y 8 (total de 5 administraciones administradas una vez por semana). Las soluciones se administraron usando una aguja de 27G penetrando el tendón rotuliano e inyectando 0,3 ml/rodilla por administración. Los conejos se sacrificaron en la semana 9 para adquirir especímenes de tejido de la articulación de la rodilla. No se observaron inflamación de infecciones, reacciones de cuerpos extraños y similares en ninguna de las rodillas.

(2) Resultados

(Observaciones generales)

El aspecto de la articulación de la rodilla entera (cartílago articular de la rodilla del fémur y tibia) se observó macroscópicamente. Aquellos resultados se muestran en la FIG. 9. En el grupo A (grupo de dosis de solución salina fisiológica) se observaron numerosos hallazgos de osteoartritis, que incluyen defectos del cartílago y osteofitos, macroscópicamente. El grado de daño al cartílago (tamaño, profundidad) fue más leve en los otros grupos que en el grupo A. La puntuación de los hallazgos macroscópicos dio resultados similares.

(Tinción)

Se fijaron especímenes de tejido de la articulación de la rodilla con paraformaldehído, se descalcificaron y se incorporaron en parafina. Los especímenes se evaluaron histológicamente por tinción con safranina O. Aquellos resultados se muestran en la FIG. 10. Las porciones superiores de cada figura indican cartílago femoral, mientras que las porciones inferiores indican cartílago tibial, y se evaluaron cambios degenerativos del cartílago en el cartílago en ambas localizaciones. La disminución de la tinción de la matriz de cartílago y la elevada aspereza de la superficie del cartílago se observaron en el grupo A (grupo de dosis de solución salina fisiológica). En el grupo B (grupo de dosis de soluciones al 1 % de hialuronato de sodio), aunque la superficie del cartílago fue más suave que en el grupo A, se observó disminución de la tinción. En el grupo C (grupo de dosis de soluciones al 1 % de alginato de sodio purificado) y grupo D (grupo de dosis de soluciones al 2 % de alginato de sodio purificado), la superficie del cartílago fue suave y las disminuciones en la tinción fueron suaves en comparación con los grupos A y B. Además, estuvo presente ácido algínico residual sobre la superficie del cartílago.

Basándose en los hallazgos anteriores, la inyección intra-articular de alginato de sodio demostró acción que inhibió la degeneración de cartílago y protegió al cartílago en un modelo de OA de resección de LCA, y se observaron efectos que fueron iguales a o mejores que la administración de soluciones al 1 % de hialuronato de sodio usada como fármaco terapéutico para osteoartritis. Además, como el alginato de sodio se adhirió a la superficie del cartílago, se confirmó que el alginato de sodio demostró afinidad con cartílago articular, además de cubrir y proteger superficies del cartílago.

Ejemplo 4

Evaluación de efectos terapéuticos del ácido algínico de diferentes pesos moleculares en un modelo de osteoartritis de conejo (modelo de resección de ligamento cruzado anterior (LCA))

(1) Procedimiento

Se creó un modelo de OA en ambas articulaciones de la rodilla de conejos blancos japoneses hembra (pesos corporales: 2,6 a 2,9 kg) según el procedimiento de Vignon, E. y col. (Vignon, E., Bejui, J., Mathieu, P., Hartmann, JD, Ville, G., Evreux, JC, y col., Histological cartilage changes in a rabbit model of osteoarthritis, J. Rheumatol., 1987:14 (Spec No): 104-6). Se asignaron cinco animales cada uno (10 rodillas) a los cinco siguientes grupos.

A) Grupo de control (solución salina fisiológica)

B) Grupo de dosis de soluciones al 1 % de hialuronato de sodio (ARTZ (marca registrada), Kaken Pharmaceutical Co., Ltd., peso molecular: aprox. 900.000, viscosidad: aprox. 2300 mPa·s)

C) Grupo de dosis de soluciones al 2 % de alginato de sodio purificado (Pronova™ SLM_{20}, FMC Biopolymer Inc., peso molecular: aprox. 400.000)

D) Grupo de dosis de soluciones al 2 % de alginato de sodio purificado (Kimica Corp., esterilizado, peso molecular: aprox. 1.000.000)

E) Grupo de dosis de soluciones al 2 % de alginato de sodio purificado (Sea Matrix (esterilizado), Kimica Corp., peso molecular: aprox. 1.700.000)

La soluciones de C) a E) se prepararon usando solución salina fisiológica.

Tras la resección del ligamento cruzado anterior, cada una de las soluciones A) a E) anteriores se administraron a la cavidad articular en las semanas 4, 5, 6, 7 y 8 (total de 5 administraciones administradas una vez por semana). Las soluciones se administraron usando una aguja de 27G penetrando el tendón rotuliano e inyectando 0,3 ml/rodilla por administración. Los conejos se sacrificaron en la semana 9 para adquirir especímenes de tejido de la articulación de la rodilla. No se observaron inflamación de infecciones, reacciones de cuerpos extraños y similares en ninguna de las rodillas.

(2) Resultados

(Observaciones generales)

El aspecto de la articulación de la rodilla entera (cartílago articular de la rodilla del fémur y tibia) se observó macroscópicamente. Con el fin de evaluar el grado de daño a la superficie del cartílago, los especímenes se tiñeron en tinta india según el procedimiento de Choji Shimizu y col. y luego se puntuaron (J. Rheumatol., vol. 25, pág. 1813-1819, 1998). Los hallazgos macroscópicos se muestran en la FIG. 11. Cuando se tiñe con tinta india, los límites entre lesiones por daño al cartílago y cartílago normal se colorean. En el grupo A (grupo de dosis de solución salina fisiológica) se observaron macroscópicamente numerosos hallazgos de osteoartritis, que incluyen defectos del cartílago que oscilan de profundos a amplios y osteofitos. El grado de daño al cartílago (tamaño, profundidad) fue más leve en los otros grupos que en el grupo A. Los resultados de puntuar los hallazgos macroscópicos se muestran en la FIG. 12. Las articulaciones de la rodilla se observaron en cuatro localizaciones que consisten en el cóndilo femoral medial (CFM), meseta tibial medial (MTM), cóndilo femoral lateral (CFL) y meseta tibial lateral (MTL). El grado de daño al cartílago fue más leve en los grupos B a E que en el grupo A en todos estos sitios. Además, el grado de daño al cartílago tendió a ser más suave en los grupos D y E que en los grupos B y C. Se creyó que las diferencias en los efectos inhibidores del cambio degenerativo de cartílago, efectos protectores del cartílago y efectos de reparación del cartílago estaban presentes debido a diferencias en el peso molecular del ácido algínico.

(Tinción de proteoglucanos)

Se fijaron especímenes de tejido de la articulación de la rodilla en paraformaldehído, se descalcificaron y se incorporaron en parafina. Los especímenes se evaluaron histológicamente por tinción con safranina O. Aquellos resultados se muestran en la FIG. 13. Las porciones superiores de cada figura indican cartílago femoral, mientras que las porciones inferiores indican cartílago tibial, y se evaluaron cambios degenerativos de cartílago en cartílago en ambas localizaciones. La disminución de la tinción de la matriz de cartílago y la elevada aspereza de la superficie del cartílago se observaron en el grupo A (grupo de dosis de solución salina fisiológica). En el grupo B (grupo de dosis de soluciones al 1 % de hialuronato de sodio), aunque la superficie del cartílago fue más suave que en el grupo A, se observó disminución de la tinción. En los grupos de dosis de soluciones de alginato de sodio (grupos C a E), la superficie del cartílago fue suave y las disminuciones en la tinción fueron suaves en comparación con los grupos A y B. Además, estuvo presente ácido algínico residual sobre la superficie del cartílago.

(Evaluación histopatológica global)

Se evaluaron completamente observaciones macroscópicas y observaciones por tinción puntuando según el procedimiento de Toshiyuki Kikuchi y col. para evaluar efectos de los fármacos administrados (Osteoarthritis and Cartilage, vol. 4, pág. 99-110, 1996). Se evaluaron cóndilos femorales mediales a uno de los cuatro niveles para los 8 parámetros indicados más adelante, y la puntuación total se usó como una puntuación de lesión de osteoartritis.

(1) Pérdida de superficie del cartílago, (2) erosión del cartílago, (3) fibrosis y crujido, (4) pérdida de proteoglucano teñible, (5) alteraciones en la disposición de condrocitos, (6) pérdida de condrocitos, (7) pérdida de hueso subcondral y (8) formación de agrupaciones de condrocitos.

Se usó ANOVA para probar la presencia de una diferencia significativa entre grupos, y se hicieron posteriores comparaciones entre cada grupo a un nivel de significancia de $p<0,05$ usando una prueba a posteriori.

Los resultados se muestran en la FIG. 14. Las puntuaciones de lesión por osteoartritis fueron significativamente inferiores en los grupos B a E frente al grupo A. Además, aunque se observaron efectos superiores en los grupos de dosis de ácido algínico de alto peso molecular (grupos D y E) en comparación con el grupo de dosis de ácido hialurónico (grupo B), los efectos del grupo de dosis de ácido algínico de bajo peso molecular (grupo C) fueron

aproximadamente los mismos que aquellos del grupo de dosis de ácido hialurónico.

Basándose en los hallazgos anteriores, la inyección intra-articular de alginato de sodio demostró acción que inhibió cambios degenerativos de cartílago y protegió al cartílago en un modelo de OA de resección de LCA, y se observaron efectos que fueron iguales a o mejores que la administración de soluciones al 1 % de hialuronato de sodio usada como fármaco terapéutico para osteoartritis. En particular, el ácido algínico de alto peso molecular demostró efectos terapéuticos superiores al ácido hialurónico. Además, aunque los tres tipos de ácido algínico se diferenciaron en términos de viscosidad, ya que el ácido algínico tiene viscosidad inferior a la del ácido hialurónico, se observa que demuestra efectos iguales a o mayores que aquellos de ácido hialurónico, se cree que las diferencias en los efectos terapéuticos son atribuibles a diferencias en la sustancia usada y peso molecular en vez de diferencias en la viscosidad.

En el modelo de OA de resección de LCA usado en este experimento, los fármacos se administraron a partir de 4 semanas después de la resección de LCA. Así, se cree que las disminuciones en las puntuaciones de lesión de osteoartritis observadas en los grupos de dosis de fármaco son el resultado combinado de efectos que inhiben la progresión de lesiones debidas a la inhibición de cambios degenerativos de cartílago y protección de cartílago, además de la acción de reparación de cartílago en daños del cartílago que ya se habían producido. Según el documento por Toshiyuki Kikuchi anteriormente mencionado citado como referencia en este experimento, se informa que las puntuaciones de OA alcanzan de 20 a 25 en los grupos de dosis de solución salina fisiológica. Como la administración de fármaco empezó en la semana 4 después de la resección de LCA en este experimento, existe la posibilidad de que las puntuaciones de OA disminuyeran como resultado de mejora del estado del cartílago debido a los efectos de los fármacos como resultado de empezar la administración a partir de un estado en el que las puntuaciones de OA eran aproximadamente 20 a 25. Además, como la puntuación para articulaciones normales es 8 en el sistema de evaluación usado en este experimento, puede decirse que la puntuación de OA media (11,3) en el grupo E (ácido algínico que tiene un peso molecular de 1.700.000) se aproxima a la puntuación para articulaciones normales y es una puntuación extremadamente buena.

Ejemplo 5

Estudio de procedimiento de medición del peso molecular de ácido algínico

Se sabe que se obtienen diferentes valores cuando se mide el peso molecular de sustancias de alto peso molecular derivadas de un origen natural dependiendo del procedimiento de medición. Según ASTM F2064-00 (ASTM International Publication (2006); la Asociación estadounidense para pruebas de materiales es una organización dedicada a la normalización internacional y el establecimiento de especificaciones de normas de materiales industriales y normas de procedimientos de ensayo), el uso de SEC-MALLS (cromatografía de exclusión por tamaño con detección de la dispersión de luz láser de ángulo múltiple) se recomienda para la medición del peso molecular. Por tanto, se hizo una comparación entre la medición del peso molecular del alginato de sodio usado en el Ejemplo 4 por SEC-MALLS y por cromatografía de filtración en gel como se describe en el Ejemplo 2. Además, SEC-MALLS combina el uso de un detector de la dispersión de luz láser de ángulo múltiple (MALLS) con cromatografía de filtración en gel.

(1) Procedimiento

La medición por cromatografía de filtración en gel se llevó a cabo del mismo modo que el Ejemplo 2. La medición por SEC-MALLS se llevó a cabo en las condiciones indicadas a continuación.

Detector de la dispersión de luz láser de ángulo múltiple: DAWN HELEOS, Wyatt Technology

Columna: Shodex SB-806M, 2 columnas (Showa Denko K.K.)

Eluato: Soluciones acuosa 200 mM de nitrato de sodio

Velocidad de flujo: 1,0 ml/min

(2) Resultados

(Tabla 2)

	AL170	AL100	AL40
Peso molecular ponderado medio como se ha determinado por cromatografía de filtración en gel	1.700.000	1.000.000	410.000
Peso molecular ponderado medio como se ha determinado por SEC-MALLS	185.000	149.000	128.000
(Referencia) Efectos farmacológicos en el Ejemplo 4	Muy buenos	Muy buenos	Buenos

El mismo alginato de sodio purificado (de baja endotoxina) usado en el Ejemplo 4 se usa para AL170, AL100 y AL40.

AL170: Kimica Corp., Mochida International Ltd., Sea Matrix (esterilizado), 1 % de viscosidad: aprox. 500 mPa·s

AL100: Kimica Corp., esterilizado, 1 % de viscosidad: aprox. 100 mPa·s

AL40: FMC Biopolymer Inc., Pronova™ SLM_{20}, 1 % de viscosidad: aprox. 30 mPa·s

(3) Discusión

Como se muestra en la Tabla 2, solo se observaron diferencias en los pesos moleculares de los tres tipos de alginatos como se ha determinado por SEC-MALLS dentro de un intervalo que no indicó definitivamente una diferencia entre ellos, y aquellos valores se diferenciaron considerablemente de resultados de medición obtenidos por cromatografía de filtración en gel. Como se muestra en el Ejemplo 4, como hubo diferencias bien definidas en efectos farmacológicos entre las muestras usadas, se encontró que los pesos moleculares determinados por cromatografía de filtración en gel demostraron una mayor correlación con efectos terapéuticos de alginatos que los pesos moleculares que se han determinado por SEC-MALLS, y se encontró que los pesos moleculares determinados por cromatografía de filtración en gel eran adecuados como parámetros para especificar un intervalo de peso molecular preferible de alginatos usados en la composición para tratar una enfermedad de las articulaciones.

Ejemplo 6

Efectos de ácido algínico sobre dolor por artritis experimental en ratas

(1) Procedimiento

Ratas con artritis inducida por inyección intra-articular de cristales de urato de monosodio (MSU) aciculares presentan una marcha anormal debido al dolor. Se preparó un modelo de dolor por artritis experimental en ratas administradas con MSU según el procedimiento de Shizuhiko Ihara, y col. (Folia Pharmacol. Japon, vol. 100, pág. 359-365 (1992)) para evaluar los efectos de la administración intra-articular de alginato de sodio.

Se compraron ratas Cr1:CD macho a la edad de 5 semanas y se usaron en el experimento tras un periodo de aclimatación de una semana. Se inyectaron 0,05 ml de una suspensión al 5,0 % de solución salina fisiológica de MSU en la articulación de la rodilla derecha de las ratas bajo anestesia, seguido de observación de la marcha a 2, 4, 6 y 24 horas después de la inyección. La marcha se evaluó puntuando a uno de cinco grados que consiste en marcha normal (0 puntos), suave cojera (1 punto), cojera moderada (2 puntos), caminar sobre los dedos (3 puntos) y caminar a tres patas (4 puntos). Diez animales se asignaron a cada uno de los cinco grupos indicados a continuación.

A) Grupo de control (grupo de dosis de solución salina fisiológica)

B) Grupo de dosis de soluciones al 1 % de hialuronato de sodio (ARTZ (marca registrada), Kaken Pharmaceutical Co., Ltd., peso molecular: aprox. 900.000)

C) Grupo de dosis de soluciones al 2 % de alginato de sodio purificado (Kimica Corp., esterilizado, peso molecular: aprox. 1.000.000)

D) Grupo de dosis de soluciones al 1 % de alginato de sodio purificado (Sea Matrix (esterilizado), Kimica Corp., peso molecular: aprox. 1.700.000)

E) Grupo de dosis de soluciones al 2 % de alginato de sodio purificado (Sea Matrix (esterilizado), Kimica Corp., peso molecular: aprox. 1.700.000)

Se administraron 50 µl de cada soluciones al mismo sitio de la articulación una hora antes de la inyección de MSU.

(2) Resultados y discusión

En la FIG. 15 se muestran cambios basados en el tiempo en puntuaciones de marcha. Las puntuaciones de marcha del grupo de dosis de soluciones al 1 % de hialuronato de sodio (grupo B) y grupos de dosis de soluciones al 2 % de alginato de sodio (grupos C y E) fueron significativamente inferiores al grupo de control (grupo A), y se observaron efectos supresores del dolor. Se observaron efectos supresores del dolor dependientes de la dosis en una comparación de las soluciones al 1 % y 2 % que contienen alginato de sodio que tienen un peso molecular de aproximadamente 1.700.000 (grupos D y E). Además, las soluciones al 2 % de alginato de sodio que tienen pesos moleculares de 1.000.000 y 1.700.000 demostraron efectos supresores del dolor iguales a pesar de tener diferentes viscosidades de aproximadamente 300 mPa·s y aproximadamente 5000 mPa·s, respectivamente.

En articulaciones, el MSU actúa directamente o indirectamente sobre células sinoviales y neutrófilos, y se cree que produce artritis mediante la producción de citocinas y similares (publicación anteriormente mencionada por Shizuhiko Ihara, y col.). Concretamente, el MSU induce dolor como resultado de reacción inflamatoria que se induce así. La soluciones de alginato de sodio demostró efectos supresores del dolor en este modelo, y los efectos observados fueron iguales a aquellos de hialuronato de sodio, que se usa como fármaco terapéutico para osteoartritis y como fármaco supresor del dolor de las articulaciones para la artritis reumatoide crónica. Se confirmó que una sal metálica monovalente de ácido algínico de la presente solicitud tenía efectos que inhibieron la inflamación y dolor, y se cree que es útil como fármaco terapéutico para la artritis reumatoide.

Además, se observó que el alginato de sodio que tiene un peso molecular de 430.000 (Kimica Corp., esterilizado) tendía a tener efectos supresores del dolor más débiles que el alginato de sodio que tiene un peso molecular de 1.000.000. Se creyó que esta diferencia en los efectos supresores del dolor era atribuible a la diferencia en el peso molecular del ácido algínico.

Ejemplo 7

Efectos de la administración intra-articular de ácido algínico en el modelo de rotura del manguito de los rotadores de conejo

(1) Producción de modelo de rotura del manguito de los rotadores

Se produjo un modelo de rotura del manguito de los rotadores usando conejos blancos japoneses. Después de afeitar ambas articulaciones del hombro de los animales bajo anestesia general usando clorhidrato de ketamina, las articulaciones del hombro se expusieron con una vía posterior usando un procedimiento estéril. El músculo omovertebral se separó entonces para producir defectos que miden 10 x 7 mm en el tendón del músculo infraespinoso y la inserción del mismo en el lado de la cabeza humeral. Se inyectaron 0,3 ml de una soluciones al 2 % de alginato de sodio purificado (Sea Matrix (esterilizado), Kimica Corp., peso molecular: aprox. 1.700.000) en la articulación del hombro derecho. Se inyectaron 0,3 ml de solución salina fisiológica (Otsuka Pharmaceutical Co., Ltd.) en la articulación del hombro izquierdo usando el mismo procedimiento para su uso como control. Tras el procedimiento, los animales se dejaron mover libremente en sus jaulas sin inmovilizar las extremidades superiores. Tras el procedimiento, después de administrar continuamente soluciones de alginato en el hombro derecho y solución salina fisiológica en el hombro izquierdo una vez a semana durante cinco semanas (total de 5 administraciones), los animales se sacrificaron por administración intravenosa de grandes dosis de pentobarbital, seguido de adquisición de especímenes de tejido de la articulación del hombro.

(2) Resultados

Aunque se observaron graves defectos del cartílago en sitios a lo largo del desgarro del manguito de los rotadores en el grupo de control tras la observación macroscópica de la cabeza humeral, no hubo daños bien definidos del cartílago observados en el grupo de dosis de alginato (FIG. 16). El alginato de sodio demostró efectos protectores del cartílago e inhibió la aparición y progreso de daño al cartílago.

Ejemplo 8

Medición de coeficientes de fricción de la articulación de la rodilla en un modelo de osteoartritis de conejo (modelo de desprendimiento del ligamento cruzado anterior (LCA))

(1) Procedimiento

Se creó un modelo de OA de conejo del mismo modo que el Ejemplo 4, se adquirieron especímenes de la articulación de la rodilla OA (n=4) administrados con soluciones al 1 % de hialuronato de sodio (ARTZ (marca registrada), Kaken Pharmaceutical Co., Ltd., peso molecular: aprox. 900.000, viscosidad: aprox. 2300 mPa·s) y especímenes de la

articulación de la rodilla OA (n=4) administrados con soluciones al 2 % de alginato de sodio purificado (Kimica Corp., esterilizado, peso molecular: aprox. 1.000.000) y se midieron los coeficientes de fricción de la articulación de la rodilla según el procedimiento de Tanaka, E. y col. (J. Dent. Res., mayo de 2004; 83(5): 404-7). La administración de cada fármaco se llevó a cabo del mismo modo que en el Ejemplo 4, y los conejos se sacrificaron en la semana 9 tras el corte del ligamento cruzado anterior para adquirir especímenes de la articulación de la rodilla. Las mediciones se llevaron a cabo flexionando la rodilla un ángulo de 30 grados mientras se aplicaba una carga de 1,8 kg durante un tiempo de medición de 120 segundos, y se llevaron a cabo mediciones cinco veces en cada espécimen. Como control se usó una articulación de la rodilla normal (n=1).

(2) Resultados

Las articulaciones de la rodilla OA administradas con ácido algínico demostraron coeficientes de fricción significativamente inferiores a los especímenes de la articulación de la rodilla OA administrados con ácido hialurónico (FIG. 17). Aunque articulaciones de la rodilla normal demuestran inherentemente bajos valores para el coeficiente de fricción, ya que la patología de OA progresa, el coeficiente de fricción aumenta y este aumento promueve adicionalmente destrucción de tejido. Se cree que el motivo para los bajos coeficientes de fricción en los especímenes de la articulación de la rodilla OA administrados con ácido algínico es debido a síntomas de OA que son leves, y reflejaron el tejido que se mantiene en un estado favorable. Concretamente, se cree que el estado del tejido observado en los hallazgos macroscópicos y evaluaciones histológicas del Ejemplo 4 ha sido reflejado en los coeficientes de fricción de la articulación de la rodilla.

Ejemplo 9

Efectos de la administración intra-articular de ácido algínico para artritis inducida por colágeno en ratas

Frecuentemente se usa un modelo de artritis inducida por colágeno (CIA) como modelo de artritis reumatoide, ya que la patología se asemeja a la artritis reumatoide humana (AR). Se creó un modelo de artritis inducida por colágeno en ratas con el fin de examinar los efectos de la administración intra-articular de alginato de sodio.

(1) Creación de modelo animal

Se compraron ratas macho DA/S1c (SPF) de diez semanas de edad y se usaron en el experimento después de un periodo de aclimatación de una semana. Se preparó una emulsión disolviendo colágeno tipo II bovino (Collagen Technology Research Association) en 0,01 moles/l de soluciones acuosa de ácido acético a una concentración de 1,5 mg/ml y usando un volumen igual de adyuvante incompleto de Freund (Difco). Se administró un total de 0,4 ml (contenido de colágeno: 300 µg) de esta emulsión (sensibilizada) en la piel sobre la espalda de las ratas (en 4 a 6 localizaciones) para inducir artritis.

(2) Administración de sustancias de prueba

Se asignaron diez animales cada uno a los cinco grupos indicados a continuación.

A) Grupo de control (grupo de dosis de solución salina fisiológica)

B) Grupo de dosis de 1 % de hialuronato de sodio acuoso (ARTZ (marca registrada), Kaken Pharmaceutical Co., Ltd., peso molecular: aprox. 900.000)

C) Grupo de dosis de 2 % de alginato de sodio purificado acuoso (Kimica Corp., esterilizado, peso molecular: aprox. 1.000.000)

D) Grupo de dosis de 1 % de alginato de sodio purificado acuoso (Sea Matrix (esterilizado), Kimica Corp., peso molecular: aprox. 1.700.000)

E) Grupo de dosis de 2 % de alginato de sodio purificado acuoso (Sea Matrix (esterilizado), Kimica Corp., peso molecular: aprox. 1.700.000)

El volumen de dosis de cada sustancia administrada fue 0,05 ml/rata, y las sustancias se administraron a la cavidad articular de la articulación de la rodilla trasera izquierda de los animales usando una jeringuilla de 1 ml y aguja de inyección de 2G. Los animales se dosificaron una vez al día durante cinco días que consiste en los días 0 (día de administración de colágeno), 5, 10, 15 y 20 tras la sensibilización.

(3) Observación macroscópica de la inflamación de las articulaciones

Las patas traseras izquierdas de los animales se observaron macroscópicamente diariamente después de la sensibilización y la presencia y grado de artritis se evaluaron puntuando según los criterios indicados a continuación.

Puntuación 0: Normal

Puntuación 1: Se observa rojez

Puntuación 2: Se observa rojez y ligero edema en los dedos

Puntuación 3: Edema que se extiende desde los dedos hasta la longitud completa de la pata

Puntuación 4: Se observa edema grave

Puntuación 5: Se observa deformación de la articulación

Los resultados se muestran en la FIG. 18. La rápida aparición de artritis se observó empezando en el día 14 después de la sensibilización en el grupo de control, y el grado de artritis aumentó hasta el día 25. Aunque se observaron grados de aparición similares en todos los grupos en el día 25 después de la sensibilización, la aparición tendió a retrasarse en el grupo de dosis de ácido hialurónico (grupo B) y los grupos de dosis de alginato de sodio acuoso (grupos C, D y E) en comparación con el grupo de control. El grado del retraso se observó más fuertemente en los grupos de dosis de alginato de sodio acuoso (grupos C, D y E) que en el grupo de dosis de ácido hialurónico (grupo B). Por tanto, se consideró que la sustancia de prueba tenía el potencial de inhibir la inflamación en articulaciones.

(4) Evaluaciones histopatológicas

Los animales se sacrificaron en el día 25 después de la sensibilización, seguido del corte de tejido de la articulación de la rodilla de la extremidad trasera izquierda, fijación en formalina, descalcificación con soluciones acuosa al 10 % de EDTA y fijación en parafina. Los especímenes se tiñeron con hematoxilina y eosina y con safranina O, seguido de evaluación histológica. Los especímenes se evaluaron puntuando a uno de cinco niveles que consisten en sin cambio (puntuación: 0), ligero cambio (puntuación: 1), leve cambio (puntuación: 2), cambio intermedio (puntuación: 3) y cambio grave (puntuación: 4) según parámetros de evaluación y criterios de evaluación de artritis inducida por colágeno. La membrana sinovial se observó para la infiltración de células inflamatorias, hiperplasia de células sinoviales, formación de tejido de granulación y fibrosis, y los resultados de puntuar aquellos hallazgos se muestran en la FIG. 19. Se observó la rótula para la formación de paño sobre la superficie del cartílago articular (incluyendo hiperplasia sinovial), destrucción de cartílago articular (incluyendo degeneración y fibrosis), destrucción ósea (resorción) y disminución de la tinción con safranina O (proteoglucanos reducidos), y los resultados de puntuación de aquellos hallazgos se muestran en la FIG. 20. La observación de la formación de osteofitos (formación osteoide reactiva y formación hueso periosteal de nuevo) se dirigió al cóndilo lateral del fémur en el que es más fácil formar osteofitos. Los resultados se muestran en la FIG. 21. La presencia de una diferencia significativa se probó con la prueba de la U de Mann-Whitney.

En la membrana sinovial, los grupos de dosis de alginato de sodio acuoso (grupos C, D y E) demostraron efectos inhibidores de la hiperplasia de células sinoviales, efectos inhibidores de la formación de tejido de granulación y efectos inhibidores de la fibrosis significativos con respecto al grupo de control. Además, el ácido algínico de alto peso molecular demostró efectos más potentes.

En la rótula, los grupos de dosis de alginato de sodio acuoso (grupos C, D y E) tendieron a inhibir la formación de paño, destrucción de cartílago articular y destrucción de hueso.

En el cóndilo lateral del fémur, los grupos de dosis de alginato de sodio acuoso (grupos C, D y E) tendieron a inhibir la formación de osteofitos. Además, el ácido algínico de alto peso molecular demostró efectos más potentes.

Se dice que la inflamación y el crecimiento anormal de la membrana sinovial y una excesiva respuesta inmunitaria medida por linfocitos T activados participaron en la aparición de artritis reumatoide, y se dice que la destrucción de tejido de la articulación progresa como resultado de la misma. La soluciones acuosa de alginato de sodio inhibió fuertemente la degeneración de tejido sinovial por administración intra-articular a animales del modelo de artritis inducida por colágeno. Además, la soluciones acuosa de alginato también demostró una tendencia inhibidora contra la destrucción y degeneración de hueso y cartílago. También se observó que la soluciones acuosa de alginato de sodio demostró efectos inhibidores de degeneración de tejido superiores a aquellos de soluciones de hialuronato de sodio usadas para el tratamiento del dolor de las articulaciones en la artritis reumatoide. Se cree que la inyección intra-articular de una soluciones de una sal de ácido algínico permite la obtención de efectos terapéuticos para la artritis reumatoide en forma de inhibición del progreso de y mejora de las lesiones de tejido.

APLICABILIDAD INDUSTRIAL

La composición para tratar la enfermedad de las articulaciones de la presente invención tiene efectos de reparación del cartílago, efectos que suprimen cambios degenerativos del cartílago, efectos protectores del cartílago, efectos que inhiben la inflamación de tejido de la articulación, efectos que suprimen el dolor producido por la inflamación de tejido de la articulación, efectos que inhiben la degeneración de tejido sinovial y/o efectos que inhiben la destrucción

osteocondral al ser inyectada en una articulación en un estado líquido, permitiendo así demostrar efectos terapéuticos sobre una enfermedad de las articulaciones. La composición es útil para aliviar el dolor de las articulaciones asociado a artritis reumatoide, y tratamiento de la artritis reumatoide.

REIVINDICACIONES

1. Una composición que contiene como principio activo una sal metálica monovalente de baja endotoxina de ácido algínico, pero que no contiene un agente de curado para la sal metálica monovalente de ácido algínico, para su uso en el tratamiento de la artritis reumatoide, en la que la composición es adecuada para ser inyectada en una articulación.

2. La composición para su uso en el tratamiento de la artritis reumatoide de la reivindicación 1, que es para su uso en la inhibición de la degeneración de tejido sinovial en la artritis reumatoide.

3. Una composición para su uso en el tratamiento de la artritis reumatoide de la reivindicación 1, que es para su uso en la inhibición de la destrucción de la articulación en la artritis reumatoide.

4. La composición para su uso en el tratamiento de la artritis reumatoide según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en la que la composición no contiene células.

5. La composición para su uso en el tratamiento de la artritis reumatoide según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en la que la sal metálica monovalente de baja endotoxina de ácido algínico tiene un peso molecular ponderado medio de 500.000 o más como se ha determinado por cromatografía de filtración en gel.

6. Uso de una sal metálica monovalente de baja endotoxina de ácido algínico para la fabricación de un medicamento para el tratamiento de la artritis reumatoide, en el que el medicamento es para inyección en una articulación y no contiene un agente de curado para la sal metálica monovalente de ácido algínico.

7. El uso de la reivindicación 6, en el que el medicamento es para la inhibición de la degeneración de tejido sinovial en la artritis reumatoide.

8. El uso de la reivindicación 6, en el que el medicamento es para la inhibición de la destrucción de la articulación en la artritis reumatoide.

9. El uso según cualquiera de las reivindicaciones 6 a 8, en el que el medicamento no contiene células.

10. El uso según cualquiera de las reivindicaciones 6 a 9, en el que la sal metálica monovalente de baja endotoxina de ácido algínico tiene un peso molecular ponderado medio de 500.000 o más como se ha determinado por cromatografía de filtración en gel.

Fig. 1

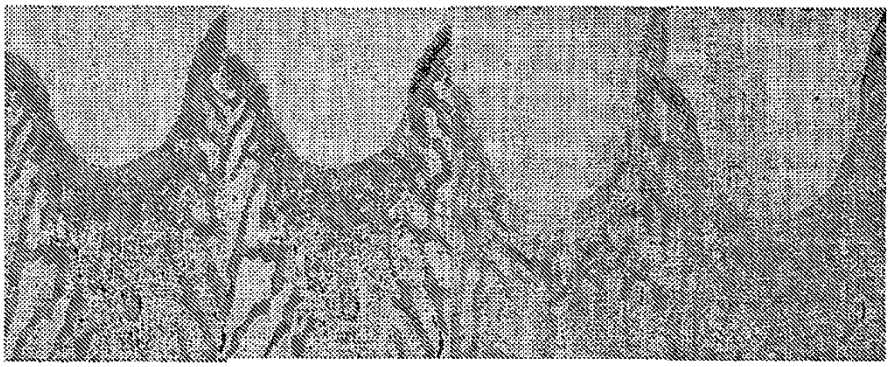
Integración del borde (tejido nuevo con respecto a cartílago nativo)	Completa	2
	Parcial	1
	Ninguna	0
Suavidad de la superficie del cartílago	Suave	2
	Intermedia	1
	Áspera	0
Superficie del cartílago, grado de llenado	Nivelada	2
	Ligera depresión	1
	En depresión/elevada	0
Color del cartílago, opacidad o translucidez del neocartílago	Transparente	2
	Translúcido	1
	Opaco	0

Fig. 2

	Característica		Puntuación
I.	Naturaleza del tejido predominante	Cartílago hialino	4
		Principalmente cartílago hialino	3
		Cartílago hialino y fibrocartílago mezclados	2
		Principalmente fibrocartílago	1
		Algo de fibrocartílago, principalmente células no condrocíticas	0
II.	Características estructurales		
	A. Regularidad superficial	Suave e intacto	3
		Laminación horizontal superficial	2
		Fisuras	1
		Alteración grave, incluyendo fibrilación	0
	B. Integridad estructural, homogeneidad	Normal	2
		Ligera alteración, incluyendo quistes	1
		Grave desintegración, alteraciones	0
	C. Espesor	100% de cartílago adyacente normal	2
		5-100% de cartílago normal	1
		0-50% de cartílago normal	0
	D. Unión a cartílago adyacente	Unido en ambos extremos o injerto	2
		Unido en un extremo o parcialmente en ambos extremos	1
		No unido	0
III.	Libertad de cambios celulares de degeneración		
	A. Hipocelularidad	Celularidad normal	2
		Ligera hipocelularidad	1
		Hipocelularidad o hipercelularidad moderada	0
	B. Agrupación de condrocitos	Sin agrupaciones	2
		< 25% de las células	1
		25-100% de las células	0
IV.	Libertad de cambios degenerativos en cartílago adyacente		
		Celularidad normal, sin agrupaciones, tinción normal	3
		Celularidad normal, leves agrupaciones, tinción moderada	2
		Hipo/hipercelularidad leve o moderada, ligera tinción	1
		Hipocelularidad intensa, escasa tinción o sin tinción	0
V.	Hueso subcondral		
	A. Reconstrucción de hueso subcondral	Normal	3
		Reconstrucción de hueso subcondral reducida	2
		Reconstrucción de hueso subcondral mínima	1
		Sin reconstrucción de hueso subcondral	0
	B. Respuesta inflamatoria en la región de hueso subcondral		
		Ninguna/leve	2
		Moderada	1
		Intensa	0
VI.	Tinción con safranina-O	Normal o casi normal	3
		Moderada	2
		Ligera	1
		Ninguna	0
Puntuación máxima total:		Secciones con safranina-O	28
		Sección con H&E	25

Fig. 3

(A)



(B)

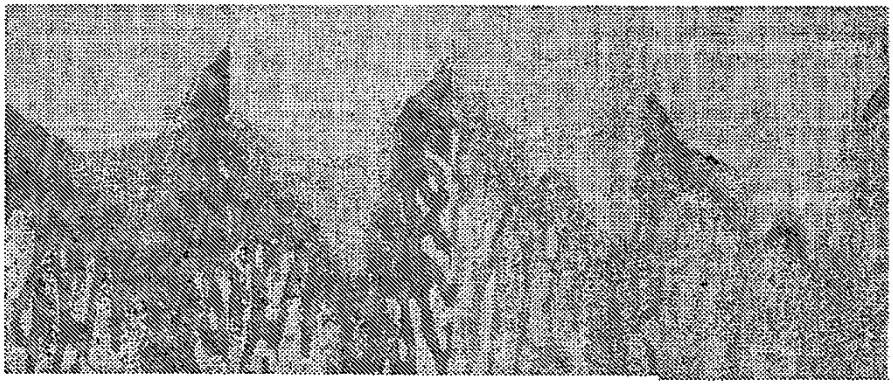


Fig. 4

(A)

(B)

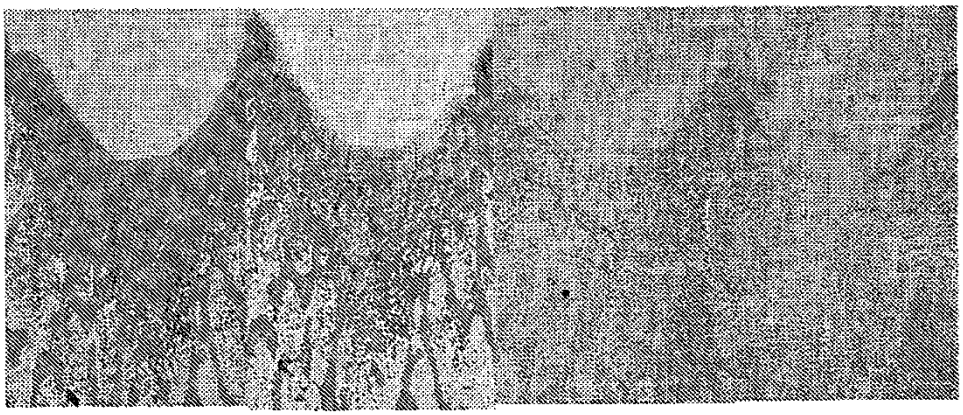
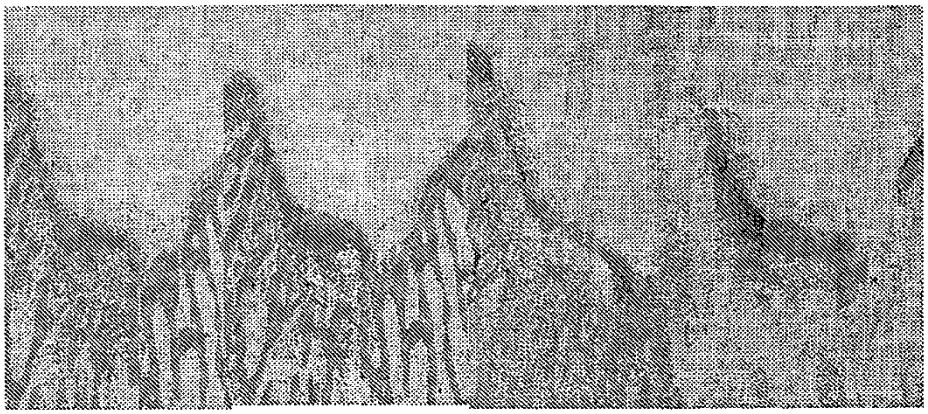


Fig. 5

(A)



(B)

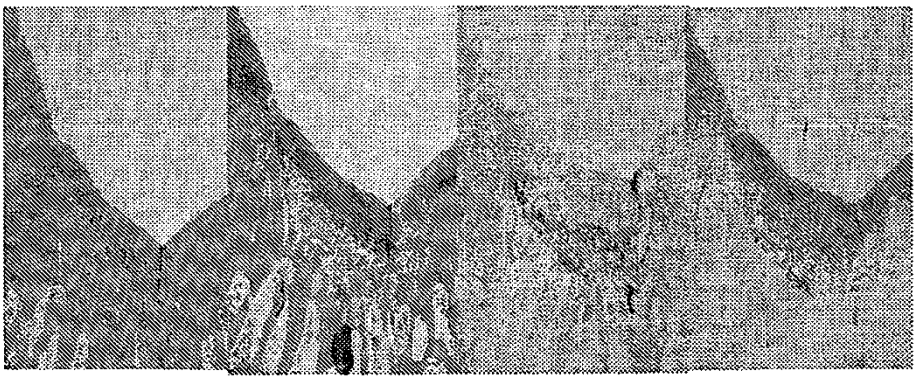


Fig. 6

(A)

(B)

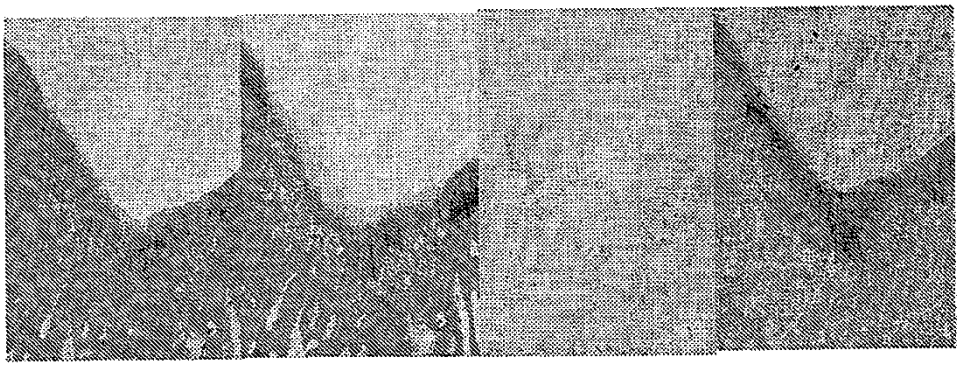


Fig. 7

	4 sem					12 sem				
	Control (vacío)	alginato calidad alimentaria (sin células)	alginato calidad alimentaria + células	alginato puro (sin células)	alginato puro + células	Control (vacío)	alginato calidad alimentaria (sin células)	alginato calidad alimentaria + células	alginato puro (sin células)	alginato puro + células
Macro										
Integración de borde	0,80	0,50	0,50	0,63	0,90	0,71	0,50	1,00	1,00	1,57
Suavidad de la superficie del cartílago	0,20	0,25	0,50	0,75	1,20	0,43	0,75	0,75	1,00	1,43
Superficie del cartílago, grado de llenado	0,20	0,75	0,50	1,13	1,40	0,57	1,00	1,00	1,71	1,71
Color del cartílago	0,20	0,00	0,17	0,63	0,70	0,14	0,25	0,25	0,86	1,00
total	1,40	1,50	1,67	3,13	4,20	1,86	2,50	3,00	4,57	5,71
Histológica										
Naturaleza del tejido predominante	0,40	0,75	0,50	0,75	1,50	0,14	0,75	0,50	1,57	1,29
Regularidad superficial	0,00	0,25	0,33	1,00	1,50	0,29	0,50	0,75	1,14	2,00
Integridad estructural, homogeneidad	0,80	1,00	0,67	0,50	0,90	0,43	0,75	0,75	1,00	1,00
Espesor	0,60	1,00	1,17	1,00	1,70	0,57	1,00	1,25	1,57	1,86
Unión a cartílago adyacente	0,80	0,25	0,67	1,00	1,30	0,71	0,50	1,25	1,43	1,71
Hipocelularidad	0,00	0,25	0,33	0,38	0,80	0,00	0,50	0,25	0,57	0,43
Agrupación de condrocitos	0,00	0,50	0,50	0,25	0,20	0,00	0,50	0,25	0,29	0,43
Cambios degenerativos en cartílago adyacente	1,20	0,75	1,50	1,88	2,80	1,29	0,75	2,00	2,57	2,86
Reconstrucción de hueso subcondral	0,80	0,50	1,17	1,00	1,30	1,14	1,00	2,25	1,71	2,14
Respuesta inflamatoria	1,40	1,25	1,00	1,63	1,70	1,71	0,75	1,50	1,86	2,00
Tinción con safranina O	0,40	1,00	1,00	0,75	1,30	0,29	0,75	1,00	1,29	1,00
total	6,40	7,50	8,83	10,13	15,00	6,57	7,75	11,75	15,00	17,00
puntuación total	7,80	9,00	10,50	13,25	19,20	8,43	10,25	14,75	19,57	22,71

Fig. 8

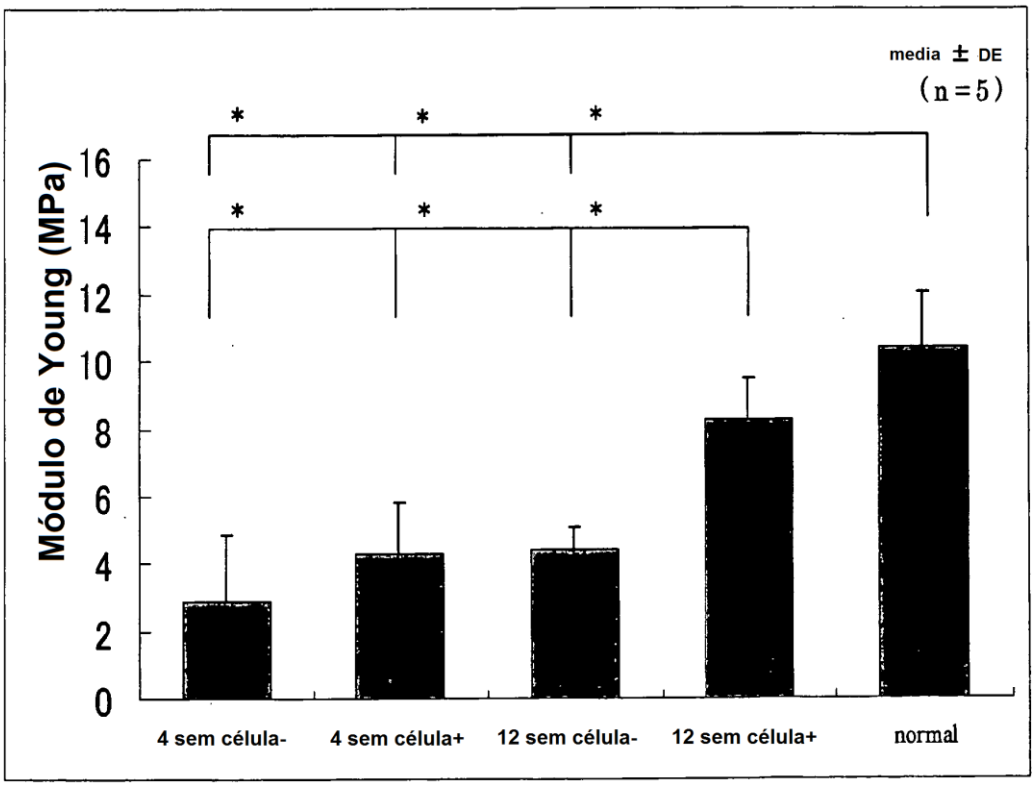

media ± DE
(n=5)
Módulo de Young (MPa)
0
2
4
6
8
10
12
14
16
*
*
*
*
*
*
4 sem célula-
4 sem célula+
12 sem célula-
12 sem célula+
normal

Fig. 9

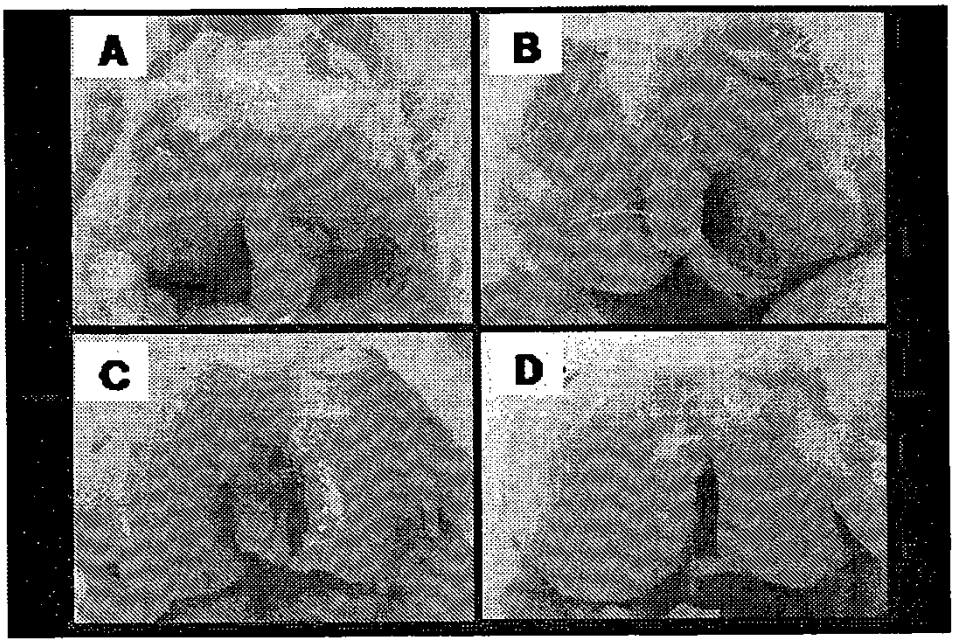
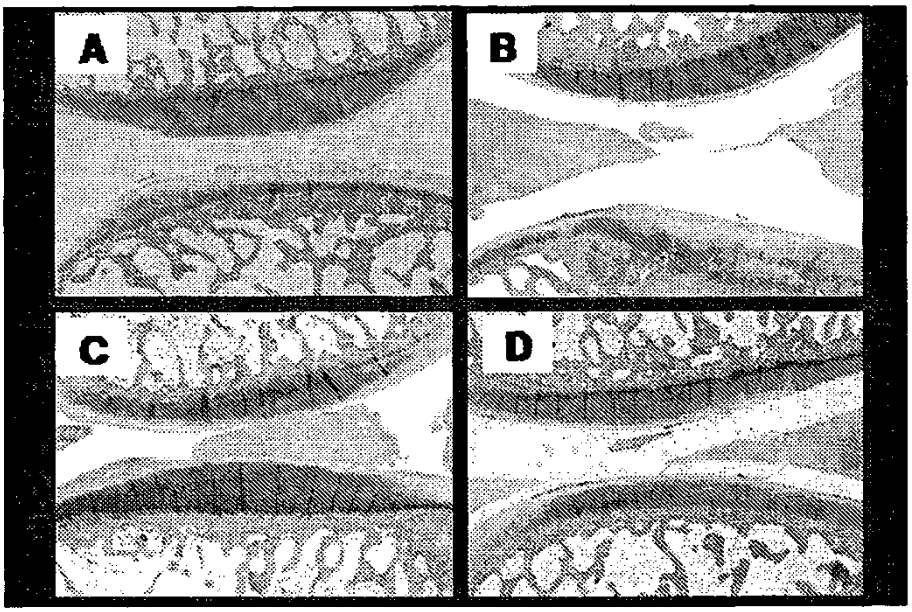


Fig. 10



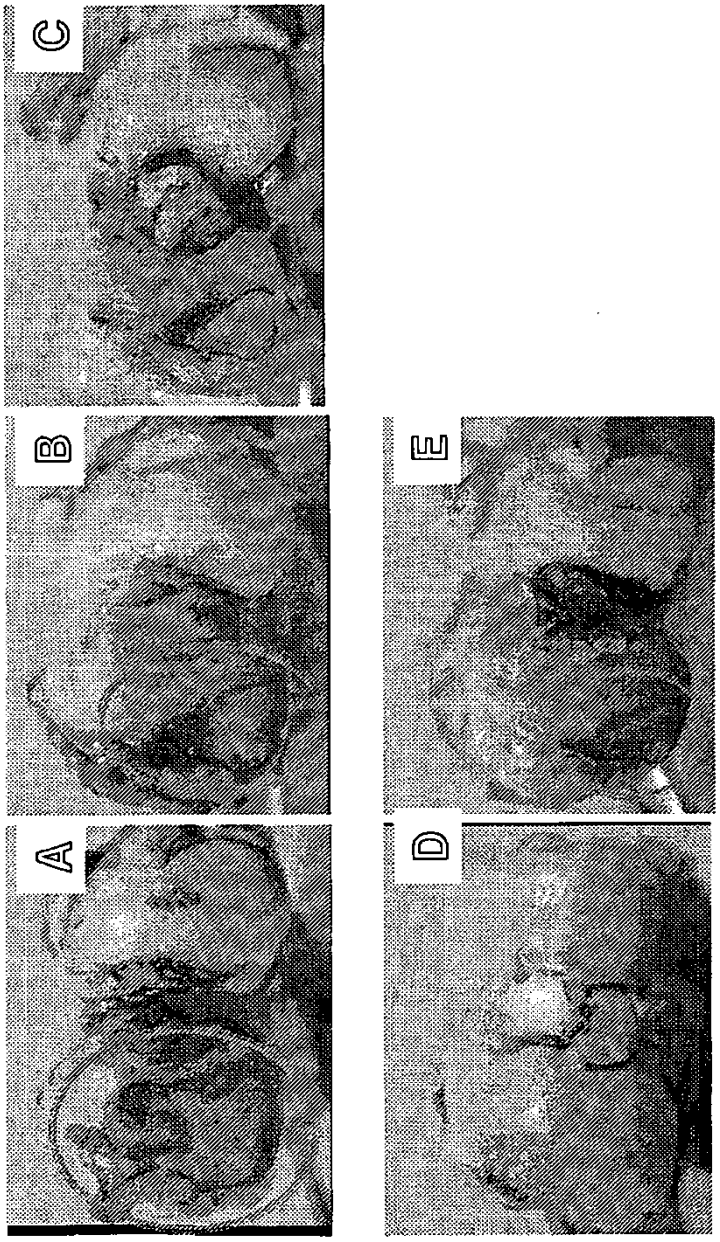
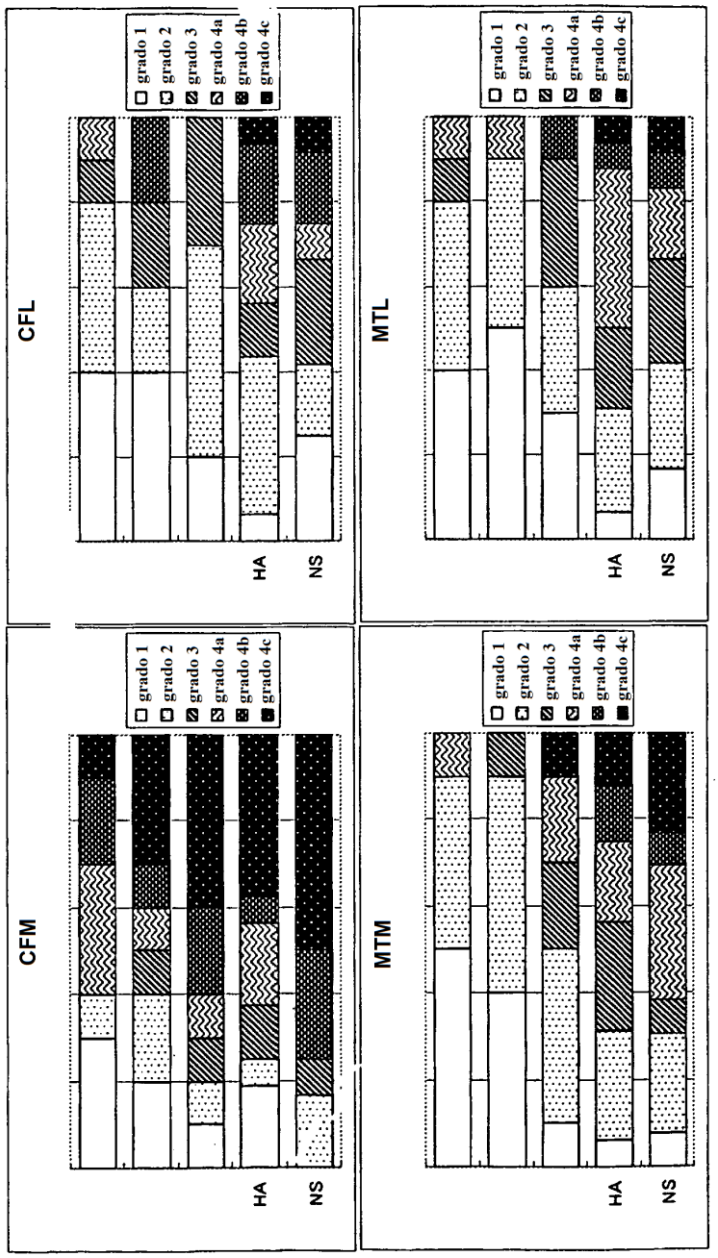


Fig. 11

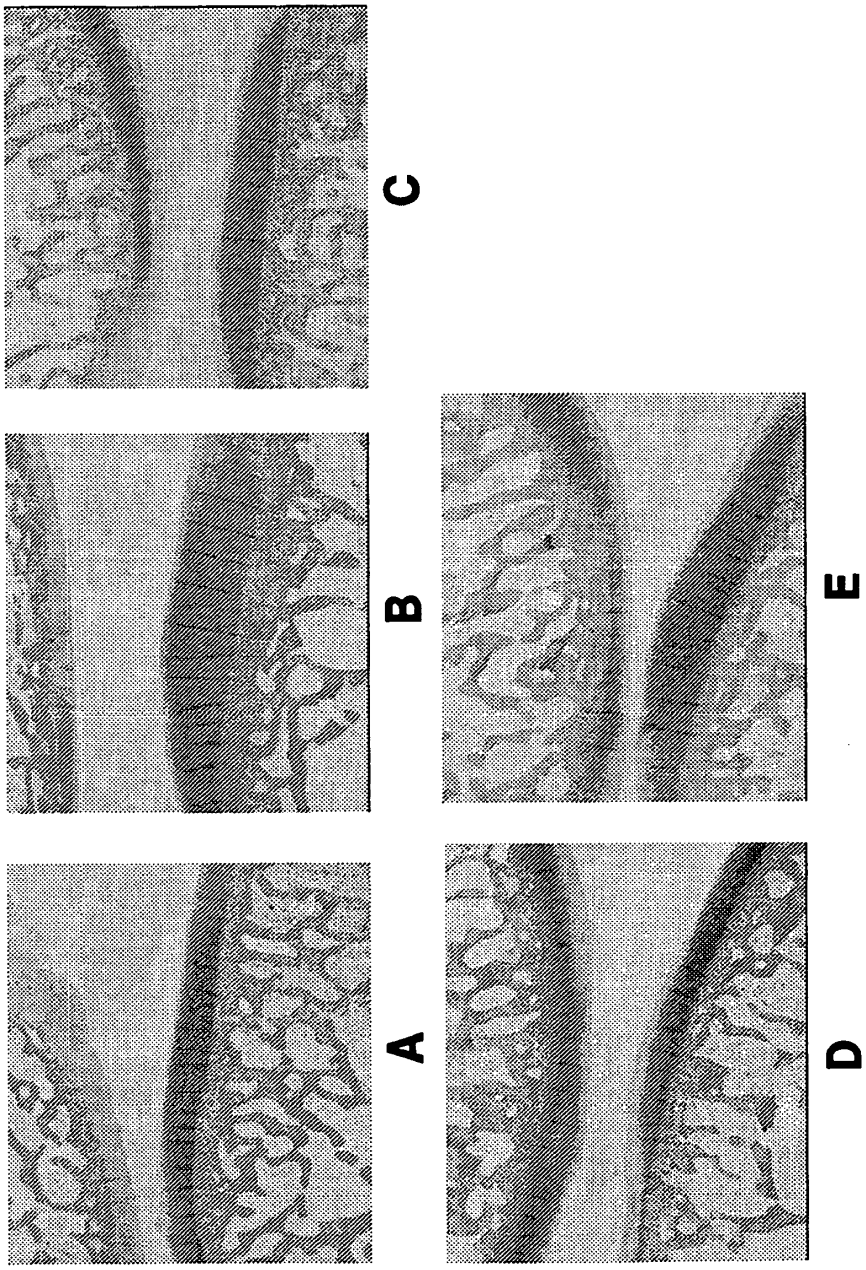
Fig. 12

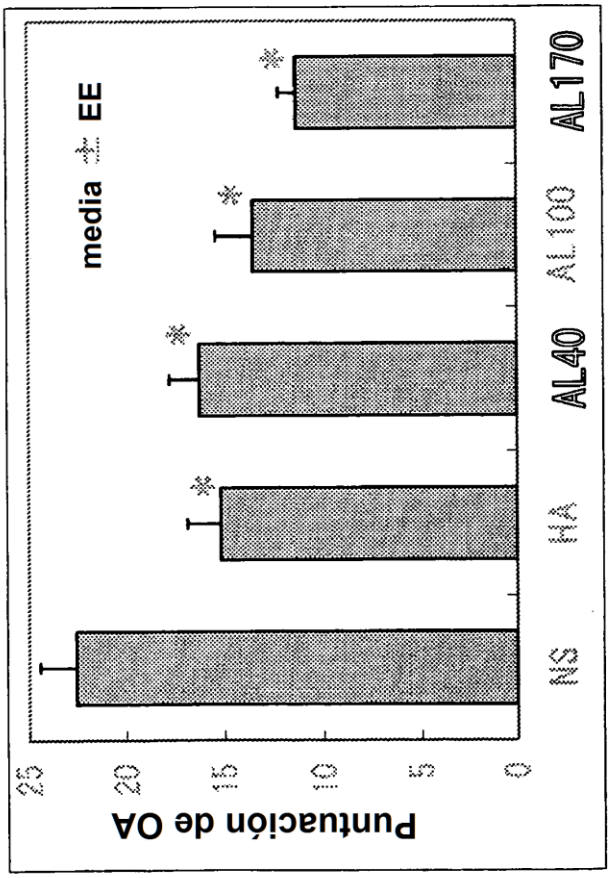


grado 1 sin captación de tinta india, que indica superficie intacta
grado 2 captación focal mínima de tinta india, leve irregularidad de la superficie
grado 3 parches oscuros focales grandes evidentes de tinta india, fibrilación manifiesta
grado 4a erosión de cartílago < 2 mm
grado 4b erosión de cartílago 2-5 mm
grado 4c erosión de cartílago > 5 mm

A : NS
B : HA
C : AL40
D : AL100
E : AL170

Fig. 13





	Media	EE
NS	22,3	1,6
HA	15,1	1,7
AL40	16,3	1,5
AL100	13,5	1,9
AL170	11,3	0,5

* : p<0,05 frente a NS

A : NS
B : HA
C : AL40
D : AL100
E : AL170

Fig .14

Fig. 15

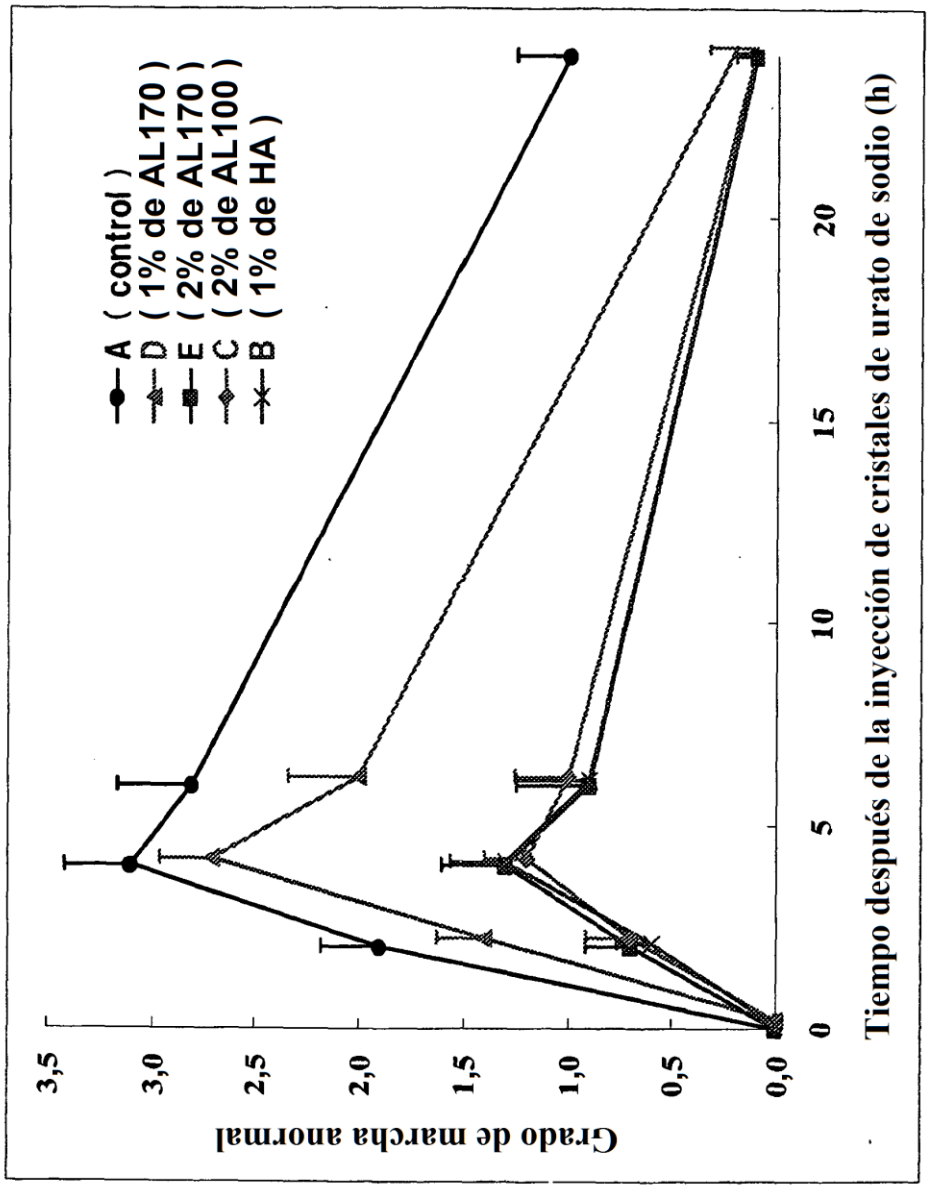

A (control)
D (1% de AL170)
E (2% de AL170)
C (2% de AL100)
B (1% de HA)
Grado de marcha anormal
3,5
3,0
2,5
2,0
1,5
1,0
0,5
0,0
0
5
10
15
20
Tiempo después de la inyección de cristales de urato de sodio (h)

Fig.16

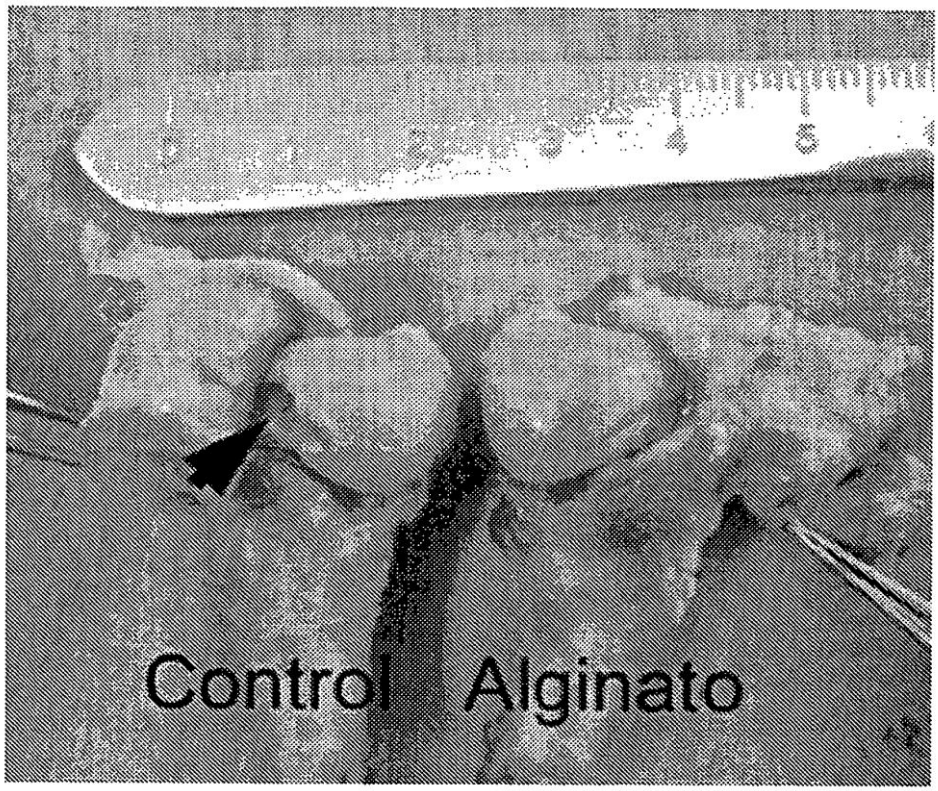


Fig. 17

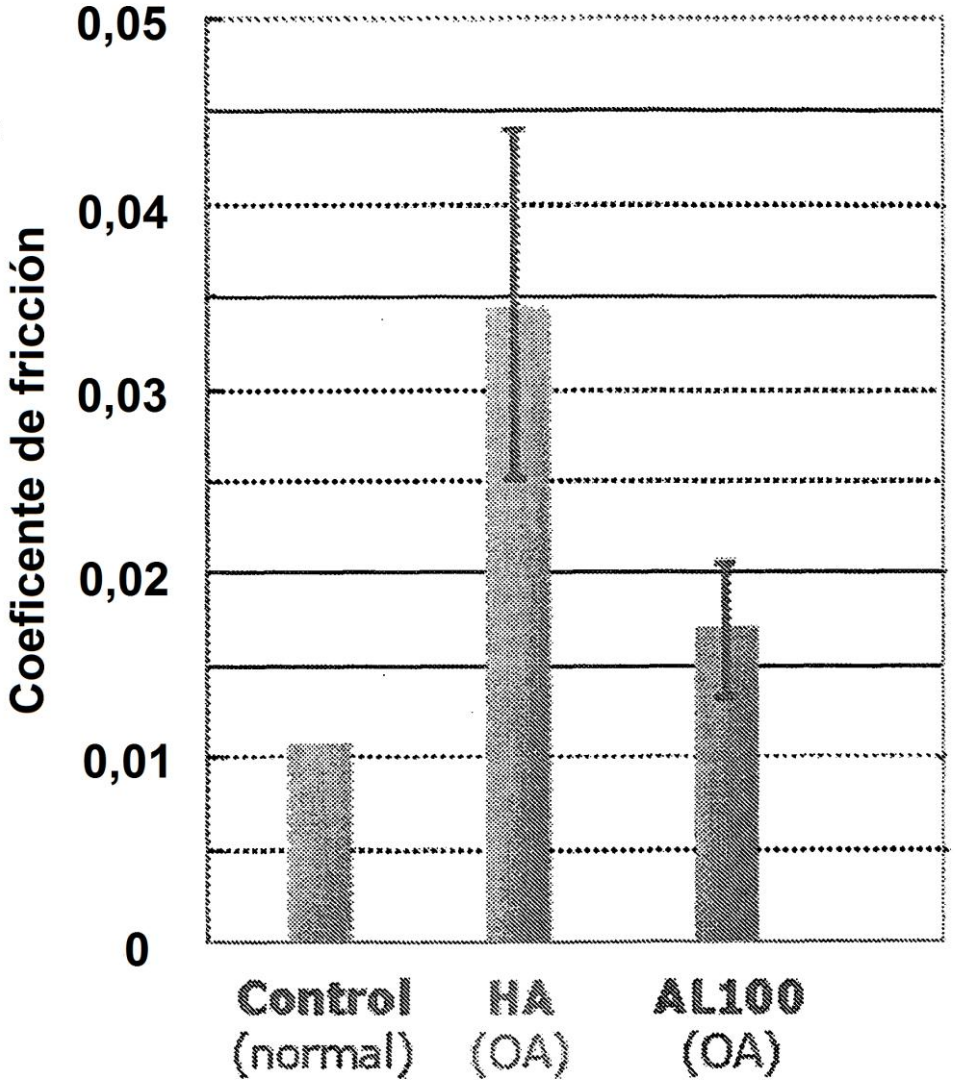

0,05
0,04
0,03
0,02
0,01
0
Coeficente de fricción
Control
(normal)
HA
(OA)
AL100
(OA)

Fig. 18

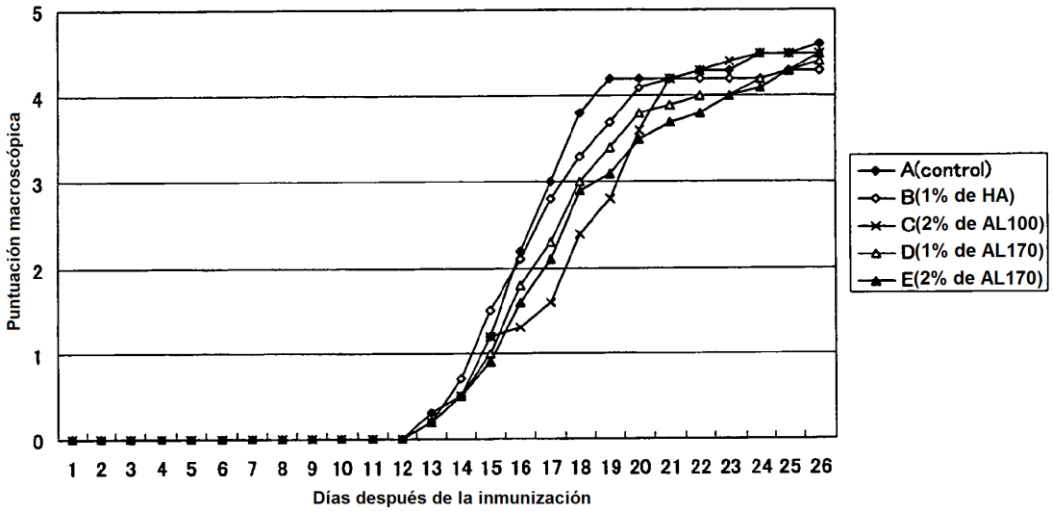

Puntuación macroscópica
0
1
2
3
4
5
1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17 18 19 20 21 22 23 24 25 26
Días después de la inmunización
A(control)
B(1% de HA)
C(2% de AL100)
D(1% de AL170)
E(2% de AL170)

Fig. 19

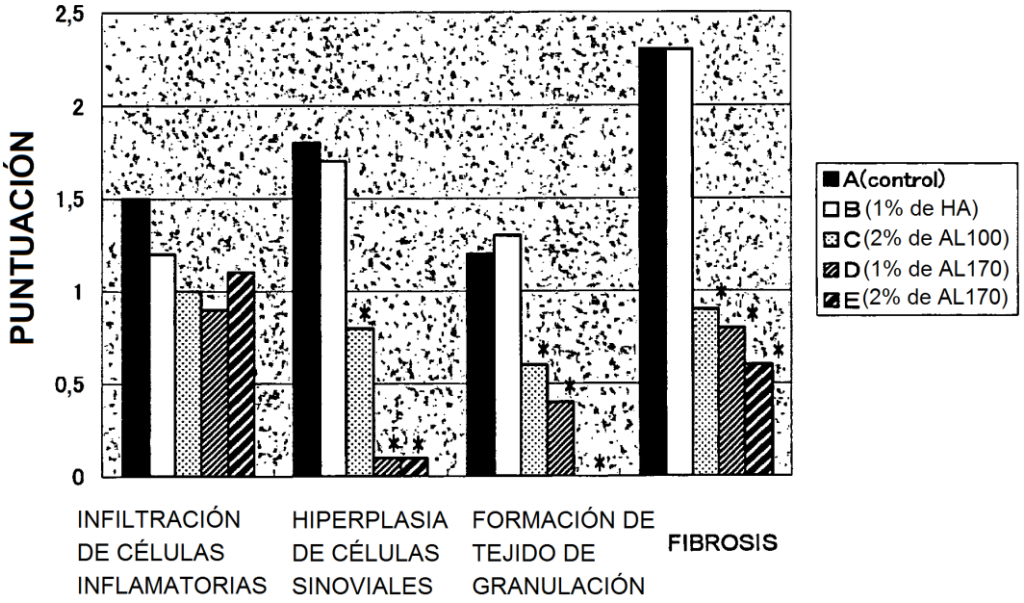

PUNTUACIÓN
2,5
2
1,5
1
0,5
0
A(control)
B (1% de HA)
C (2% de AL100)
D (1% de AL170)
E (2% de AL170)
INFILTRACIÓN DE CÉLULAS INFLAMATORIAS
HIPERPLASIA DE CÉLULAS SINOVIALES
FORMACIÓN DE TEJIDO DE GRANULACIÓN
FIBROSIS

Fig. 20

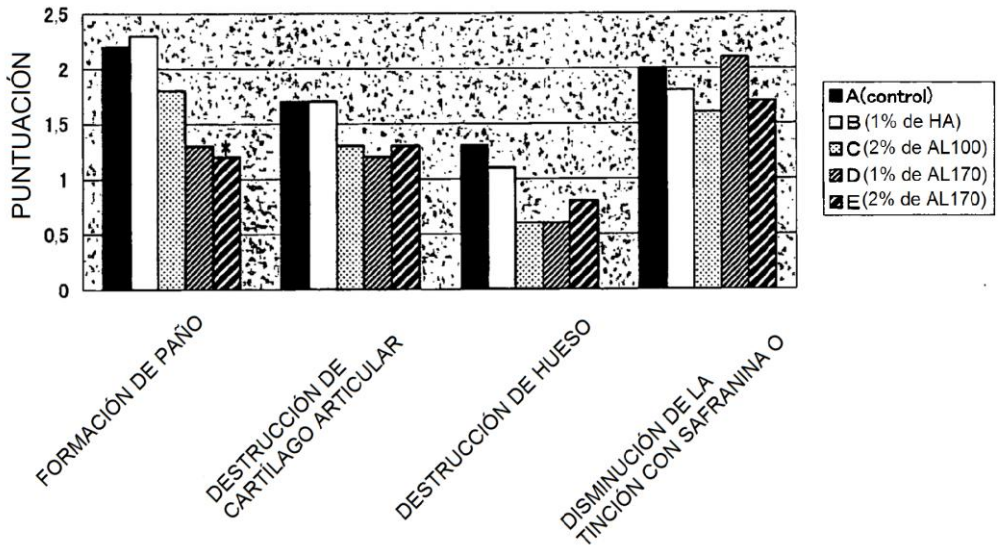
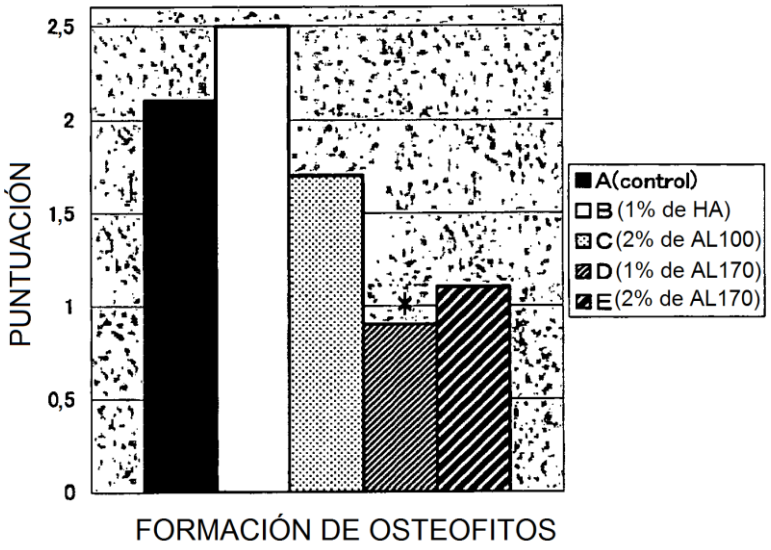

PUNTUACIÓN
2,5
2
1,5
1
0,5
0
*
A(control)
B (1% de HA)
C (2% de AL100)
D (1% de AL170)
E (2% de AL170)
FORMACIÓN DE PAÑO
DESTRUCCIÓN DE CARTÍLAGO ARTICULAR
DESTRUCCIÓN DE HUESO
DISMINUCIÓN DE LA TINCIÓN CON SAFRANINA O

Fig. 21


2,5
2
1,5
1
0,5
0
PUNTUACIÓN
FORMACIÓN DE OSTEOFITOS
A(control)
B (1% de HA)
C (2% de AL100)
D (1% de AL170)
E (2% de AL170)