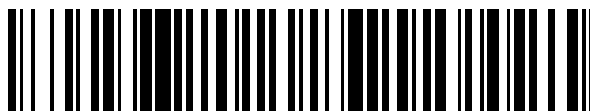


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 531 066**

51 Int. Cl.:

A61L 27/26 (2006.01)

A61L 27/52 (2006.01)

A61L 27/20 (2006.01)

A61L 27/38 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **11.02.2011 E 11702660 (9)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **03.12.2014 EP 2538986**

54 Título: **Un suplemento intraarticular para uso en el tratamiento de enfermedades y lesiones articulares**

30 Prioridad:

25.02.2010 EP 10154712

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

10.03.2015

73 Titular/es:

**UNIVERSITÉ DE LIÈGE (50.0%)
Patent Department, Avenue Pré-Aily, 4
4031 Angleur (Liege), BE y
KITOZYME S.A. (50.0%)**

72 Inventor/es:

**HENROTIN, YVES;
SANCHEZ, CHRISTELLE;
OPRENYESZK, FRÉDÉRIC y
DRION, PIERRE**

74 Agente/Representante:

VALLEJO LÓPEZ, Juan Pedro

ES 2 531 066 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

Un suplemento intraarticular para uso en el tratamiento de enfermedades y lesiones articulares

5 **Campo de la invención**

La presente invención se refiere a un método de producción de perlas esféricas de hidrogel que comprenden una mezcla de quitosano y alginato.

10 La presente invención se refiere también a un suplemento para el tratamiento de trastornos de las articulaciones, particularmente la artrosis.

Antecedentes de la invención

15 La artrosis es un trastorno degenerativo progresivo que va acompañado de dolor y que se caracteriza por un deterioro del cartílago de las articulaciones, un deterioro del líquido sinovial de las articulaciones y la consiguiente osteosclerosis.

20 La artrosis aumenta con la edad, con una probabilidad superior al 60 % en aquellas personas de 60 años o mayores.

Hoy en día, para remediar el dolor mecánico acompañado de artrosis, la terapia actual generalmente es o bien terapéutica con la administración de analgésicos o agentes anti-inflamatorios o una terapia quirúrgica con reemplazo parcial o total de la articulación. Un enfoque alternativo es la viscosuplementación, que es una inyección en la articulación de un lubricante viscoso biocompatible (por ej., ácido hialurónico) que reduce la fricción y el dolor.

25 La viscosuplementación se utiliza para suplementar el líquido sinovial que lubrica y protege las articulaciones. De hecho, en un paciente con artrosis, el líquido sinovial se modifica con una disminución de la concentración y peso molecular (Pm) de hialuronano (o sal del ácido hialurónico HA).

30 Las inyecciones intraarticulares que comprenden preparaciones de AH de alto peso molecular están actualmente disponibles y se utilizan para el tratamiento de la rodilla, cadera, articulación carpometacarpiana del pulgar o el tobillo. Estas preparaciones requieren una inyección (Durolane™, Q-Med AB, Uppsala, Suecia), tres inyecciones (Synvisc®, AH reticulado de alto peso molecular, Orthovisc®) a cinco inyecciones (Hyalgan®, Supartz®) intraarticulares (IA) (de 1 a 3 ml que contienen de 5 a 20 mg/ml de AH por inyección según la articulación).

35

Tabla 1: Preparaciones de ácido hialurónico (AH)

| Nombre comercial | Empresa | Pm medio (kD) |
|--------------------------|---------------------------|---------------|
| Synvisc® (Hylan G-20) | Biomatrix (Canadá) | 6.000-7.000 |
| Healon® | Pharmacia/Upjohn (Suecia) | 1.900-3.900 |
| Orthovisc® | Anika (EE.UU.) | 1.700-2.900 |
| Arthrum® | LCA (Francia) | 2.000 |
| Adant® | Meiji Seika (Japón) | 900-1.200 |
| SupArtz®, Artz®, Artzal® | Seikagaku (Japón) | 600-1.200 |
| Ostenil® | Chemedica (Francia) | 1.200 |
| Hyalgan® | Fidia (Italia) | 500-730 |
| Durolane™ | Q-Med AB (Suecia) | ≥ 9.000 |

40 Las preparaciones de AH varían en cuanto a una serie de características, incluyendo, por ejemplo, la fuente de AH (de origen animal o bacteriano), la concentración y el Pm del AH y el tipo y, en su caso, el grado de reticulación química utilizado. Por lo general, la mayoría de las preparaciones de AH inyectables, una vez inyectadas, tienen una semivida de residencia de horas a varios días.

Varios estudios han comparado la eficacia de los productos antes mencionados y han llegado a conclusiones diferentes en cuanto al grado de reducción del dolor y la mejora de la función de los pacientes con artrosis de rodilla. Algunos concluyeron que en el mejor de los casos, existe un pequeño efecto en comparación con la inyección de placebo. Otros observaron que de 3 a 5 inyecciones semanales de uno de los productos mencionados anteriormente, mejoraban significativamente el dolor y el estado funcional de los pacientes con artrosis y que, aunque el inicio de la mejoría se retrasó 3-4 semanas, el efecto puede durar al menos seis meses y hasta después de la interrupción del tratamiento. Se han observado otros efectos beneficiosos sobre los síntomas de la artrosis, no sólo en la artrosis de rodilla, sino también en la artrosis del tobillo y de la articulación carpometacarpiana del pulgar, aunque también se han observado efectos adversos.

50

Por otra parte, el efecto clínico puede ser tan rápido como 1 semana y puede durar seis meses o más, pero en todos los casos, las inyecciones múltiples son esenciales para conseguir un efecto prolongado (seis meses a un año) en el dolor artrósico, principalmente debido a la corta semivida de residencia de la mayoría de las preparaciones de AH.

5 Finalmente, el documento WO2007/135114 describe la viscosuplementación con composiciones de polisacáridos de una mezcla de alginato y quitosano sin generar coacervados insolubles. Los coacervados son debido a la naturaleza policatiónica del quitosano que dificulta la compatibilidad con otros polisacáridos tales como el ácido hialurónico (un polianión) o alginato. De acuerdo con el documento WO2007/135114, la precipitación/coacervación de polisacáridos tales como quitosano y alginato impide cualquier formulación de los mismos como una composición inyectable.

10 El documento WO2007/135114, por lo tanto, describe una composición con una mezcla acuosa de quitosano de un alto grado de derivatización de al menos 40 % y un alginato como altamente viscoso sin generar coacervados insolubles.

15 Sigue existiendo una necesidad de desarrollar un nuevo producto suplemento intraarticular que proteja el cartílago contra esfuerzos mecánicos, proporcione alivio efectivo a los pacientes con artrosis sin necesidad de múltiples inyecciones y evite los efectos adversos.

20 Se ha descubierto ahora un nuevo método de producción de una matriz de hidrogel homogénea que comprende alginato y quitosano, en el que el quitosano es de bajo peso molecular y coacerva. Las perlas de alginato/quitosano resultantes obtenibles mediante el nuevo método permanecen sorprendentemente homogéneas y estables cuando se utilizan para la suplementación intraarticular.

25 Se ha descubierto ahora un nuevo método y una composición para la suplementación intraarticular única de perlas de quitosano/alginato con una residencia de larga duración (al menos dos semanas) en la articulación sin aumentar la viscosidad del líquido sinovial.

El sumario anterior y la siguiente descripción no son restrictivas de la invención como se reivindica.

30 **Sumario de la invención**

Un aspecto de la presente invención se refiere a un método de producción de una matriz de hidrogel que comprende las etapas de:

- 35
- proporcionar una solución de alginato,
 - proporcionar una solución con quitosano que tiene un Pm inferior a 60 kDa,
 - mezclar la solución de alginato y la solución de quitosano, en el que la solución mezclada comprende entre 0,5 y 0,7 % (p/v) de quitosano y entre 1 y 1,4 % de alginato (p/v),
 - introducir gotitas de la solución mezclada en una solución con Ca²⁺ o Sr²⁺ y cationes
- 40
- aislar perlas gelificadas de la solución con cationes.

En ciertas realizaciones de métodos de la presente invención, las gotitas de la solución mezclada se introducen en una solución de iones Sr²⁺.

45 En realizaciones particulares de este método, la solución mezclada comprende 0,6 % de quitosano y/o comprende 1,2 % de alginato.

En realizaciones particulares de los métodos de la presente invención, la relación entre alginato y quitosano en la solución mezclada es entre 1,4 y 2,8 o entre 1,75 y 2,25 o es de aproximadamente 2.

50 En realizaciones particulares de los métodos de la presente invención el quitosano tiene un Pm de entre 35 y 45 kDa y/o es de origen animal o preferiblemente vegetal.

55 En otras realizaciones particulares de los métodos de la presente invención, el método comprende además la etapa de mezclar las perlas en un hidrogel termosensible. En la presente memoria la relación entre perlas de hidrogel es, por ejemplo, entre 5/1 y 1/1 o entre 4/1 y 2/1.

En otras realizaciones particulares de los métodos de la presente invención la formación de las perlas se realiza pasando gotitas a través de una aguja para obtener perlas con un diámetro entre 0,01 y 5 mm.

60 Otro aspecto de la presente invención se refiere a una perla esférica de hidrogel que comprende una mezcla homogénea de quitosano y alginato, en el que dicha perla se puede obtener mediante los métodos descritos anteriormente.

65 Otro aspecto de la presente invención se refiere a una perla esférica de hidrogel con un diámetro entre 0,01 y 5 mm,

que comprende una mezcla homogénea de quitosano y alginato, caracterizado por que la perla comprende entre 1 y 1,4 % de alginato y entre 0,5 y 0,7 % de quitosano, por ejemplo, la perla comprende 1,2 % de alginato, o, por ejemplo, la perla comprende 0,6 % de quitosano.

- 5 En realizaciones particulares de perlas de la presente invención, la relación de alginato/quitosano es entre 1,4 y 2,8, preferiblemente entre 1,75 y 2,25, más preferiblemente entre 1,8 y 2,2.

En otras realizaciones particulares de las perlas de la presente invención, el quitosano tiene un Pm entre 35 y 45 kDa y/o es de origen animal o vegetal.

- 10 La invención también se refiere a un suplemento intraarticular que comprende perlas esféricas de hidrogel con un diámetro entre 0,01 y 5 mm, que comprenden una mezcla homogénea de alginato y quitosano de Pm inferior a 60 kDa, caracterizado por que dichas perlas comprenden entre 1 y 1,4 % de alginato y entre 0,5 y 0,7 % de quitosano.

- 15 El suplemento intraarticular puede comprender además un gel viscoso termogelificante como, por ejemplo, un hidrogel de polisacárido, particularmente un hidrogel de quitosano.

Por polisacáridos se entienden biopolímeros tales como ácido hialurónico conocidos por tener unidades repetitivas de disacárido compuestas de ácido glucurónico y N-acetilglucosamina, alginatos y quitosano.

- 20 El quitosano es un polisacárido ampliamente disponible en la naturaleza obtenido por desacetilación química de la quitina y el constituyente principal de los exoesqueletos de los crustáceos, pero también de la pared de los hongos. Se compone de unidades de D-glucosamina y unidades de N-acetil-D-glucosamina.

- 25 El suplemento intraarticular puede comprender también un componente seleccionado del grupo que consiste en fármaco anti-inflamatorio no esteroideo, anestésico, analgésicos opioides, corticosteroides, antineoplásicos, anticuerpos monoclonales, anticuerpos monoclonales quiméricos, vitaminas, minerales, nutracéuticos.

- 30 El suplemento intraarticular también puede contener también componentes activos o inactivos adicionales incluyendo, por ejemplo, los medicamentos anti-inflamatorios no esteroideos (AINES), por ej., diclofenaco TM, ibuprofeno TM, piroxicam TM; anestésicos, por ej., lidocaína TM y bupivacaína TM; analgésicos opioides, por ej., codeína y morfina; corticosteroides, por ej., dexametasona y prednisona; agentes antineoplásicos tales como metotrexato TM; agentes anti-virales, por ej., aciclovir TM y vidarabina TM; anticuerpos monoclonales, por ej., Humira TM y anticuerpos monoclonales quiméricos, por ej., infliximab TM. Los suplementos inyectables intraarticulares también pueden contener componentes tales como células, proteínas, ADN, minerales, por ej., selenio, estroncio, vitaminas, por ej., tocoferol, nutracéuticos, por ej., curcumina u otro material activo biológicamente deseable.

- 40 Las perlas de hidrogel de la invención descritas en la reivindicación 8 se utilizan en un suplemento para el tratamiento de trastornos articulares de un sujeto y para reducir el dolor y el malestar asociados con la lesión articular o enfermedades articulares, incluyendo la artrosis y lesiones traumáticas del cartílago.

- 45 Ejemplo de tales enfermedades articulares incluyen artrosis (primaria (idiopática) o secundaria), artritis reumatoide, lesión articular (por ej., lesión traumática o por movimientos repetitivos), patología del cartílago (por ej., condrocalcinosis, condromalacia), artritis séptica. El suplemento de la invención es también para su uso en la reducción del dolor asociado con este tipo de enfermedades, para reparar la lesión de hueso y cartílago y para ralentizar la progresión de la enfermedad.

- 50 El suplemento se puede formular para proporcionar una sola o múltiples inyecciones intraarticulares o para la implantación del suplemento en una cantidad suficiente para proporcionar un efecto terapéutico.

La inyección o implante intraarticular se realiza directamente en el defecto del hueso y/o cartílago de mamíferos humanos o no humanos, por ejemplo, mediante artroscopia o con un dispositivo de inyección tal como una jeringa.

- 55 Ejemplos de sitios de administración incluyen la rodilla, hombro, tobillo, articulaciones temporo-madibular y carpo-metacarpiana, codo, cadera, muñeca, disco intervertebral.

La invención proporciona además un dispositivo de suplementación que comprende una jeringa de un solo uso precargada que tiene una dosis única de los suplementos.

- 60

Breve descripción de las figuras:

La **Figura 1** muestra perlas obtenidas de acuerdo con el método de la invención.

- 65 La **Figura 2** muestra una sección de una perla de alginato (A) y una perla de quitosano/alginato (B) [quitosano: trabéculas gris oscuro; alginato: fondo gris claro].

La **Figura 3** muestra en aumento bajo perlas de quitosano/alginate embebidas en unos hidrogeles de quitosano.

La **Figura 4** muestra la implantación de un hidrogel de quitosano termosensible que comprende perlas de 0,6 % de quitosano/1,2 % de alginate (quitosano de *A. bisporus* (40 kD)).

La **Figura 5** muestra la evaluación histológica de los implantes 15 días después de la implantación.

A: Hueso subcondral; B: Hidrogel colonizado con células; C: Perla de quitosano/alginate colonizado con células; D: Lagunas de quitosano embebidas en células.

10 Descripción detallada de la invención

Un aspecto de la presente invención se refiere a un método de producción de una matriz de hidrogel. Este método comprende los siguientes pasos:

- 15 – proporcionar una solución de alginate,
- proporcionar una solución de quitosano con un Pm inferior a 60 kDa,
- mezclar la solución de alginate y la solución de quitosano, en el que la solución mezclada comprende entre 0,5 y 0,7 % (p/v) de quitosano y entre 1 y 1,4 % de alginate,
- introducir gotitas de la solución mezclada en una solución con iones Ca^{2+} o Sr^{2+}
- 20 – aislar las perlas gelificadas de la solución con cationes.

El hidrogel que se obtiene por este método da lugar a una matriz homogénea de alginate de calcio y quitosano.

La matriz tal como se obtiene en la presente invención difiere de las matrices de la técnica anterior por tener un núcleo de un componente, recubierto de una capa de otro componente.

La matriz tal como se obtiene en la presente invención tiene la ventaja de que la porosidad de la matriz puede definirse con mayor precisión en comparación con matrices que son primero liofilizadas para obtener un cierto grado de porosidad.

La matriz tal como se obtiene en la presente invención tiene la ventaja de estar compuesta de un quitosano de bajo peso molecular en particular entre 15 y 50 kDa que forma espontáneamente una red homogénea en la matriz de alginate.

Como se indica en la sección de ejemplos, el alginate y el quitosano que se utilizan para preparar los hidrogeles se disuelven en tampones alcalinos o ácidos fuertes que tienen un efecto esterilizante. Esto es una ventaja adicional de la presente invención.

En los métodos de acuerdo con la presente invención, las soluciones de alginate y quitosano se pueden mezclar para obtener perlas con diferentes concentraciones. Las realizaciones particulares de la presente invención se refieren a las perlas en las que la composición, antes de la gelificación por los iones de calcio o de estroncio comprende 0,4, 0,45, 0,5, 0,55, 0,60, 0,65, 0,70, 0,75 o 0,80 % (p/v) de quitosano, e independientemente de la misma comprende 0,9, 0,95, 0,1, 0,105, 0,11, 0,115, 0,12, 0,125, 0,13, 0,135, 0,14, 0,145 o 1,5 % (p/v) de alginate. En realizaciones particulares, la concentración de quitosano varía de 0,5 a 0,7 % o de 0,55 a 0,65 %. En otras realizaciones particulares la concentración de alginate varía de 1 a 1,4 % o de 1,25 a 1,35 %. Una realización particular de hidrogel comprende aproximadamente 0,6 % de quitosano y aproximadamente 1,2 % de alginate.

Otras realizaciones de los métodos y composiciones de la presente invención se refieren a la composición de hidrogel y las perlas obtenidas de la misma en donde la relación entre alginate y quitosano en la solución mezclada es de entre 1,4 y 2,8, más particularmente entre 1,5 y 2,7, más particularmente entre 1,6 y 2,6, o entre 1,75 y 2,25. Los valores particulares de esta relación son aproximadamente 1,9, 1,95, 2,0, 2,05 y 1.

En los métodos de la presente invención el tamaño medio de las perlas se puede adaptar y se determina empíricamente ajustando el diámetro de la aguja que se utiliza para formar las gotitas que se introducen en la solución de calcio o estroncio. En la presente invención se contemplan perlas con un diámetro entre 0,01 y 5 mm. Estas dimensiones proporcionan un compromiso entre la facilidad de manipulación y la difusión de nutrientes en las perlas.

El quitosano de la presente invención puede ser aislado a partir de diferentes fuentes animales, tales como crustáceos (conchas de gambas) o calamares. Alternativamente, el quitosano puede ser de origen vegetal, más particularmente de origen fúngico, tal como de cepas de *Mucoralean*, *Mucor racemosus* y *Cunninghamella elegans*, *Gongronella butleri*, *Aspergillus niger*, *Rhizopus oryzae*, *Lentinus edodes*, *Pleurotus sajo-caju*, *Zygosaccharomyces rouxii*, *Candida albicans* o *Agaricus bisporus*.

El quitosano existe además en diversos tipos de peso molecular. En la presente memoria, la longitud de cadena del

quitosano puede contribuir a la estructura tridimensional de los hidrogeles. Quitosanos típicos, para uso en la presente invención pueden tener un peso molecular promedio entre 15 y 50 kDa, más particularmente entre 35 y 45 kDa.

- 5 El método de fabricación de las perlas como se describe anteriormente, da lugar a la formación de perlas esféricas de hidrogel que comprenden una mezcla homogénea de quitosano y alginato.

En realizaciones particulares, los suplementos se formulan como un material suplemento bifásico formado por perlas y un gel viscoso. Este suplemento incluye una matriz polimérica ("gel") y las perlas esféricas tridimensionales que comprenden quitosano y alginato.

15 Esto permite formular un gel implantable o inyectable el cual, tras la implantación, asegura una distribución óptima del espacio en el tejido del hospedador del órgano. El gel que se utiliza típicamente en la presente memoria en el suplemento junto con las perlas preparadas por el método de la invención, es un gel termo-sensible. Estos geles permanecen en estado líquido a temperatura ambiente (en un dispositivo utilizado para la introducción en el paciente), pero se vuelven sólidos cuando se introducen en el cuerpo a aproximadamente 37 °C. Esta gelificación in situ mantiene las perlas en su distribución espacial. Las pruebas in vitro han demostrado que las perlas se distribuían homogéneamente en un hidrogel igual que cuando se calienta a 37 °C. Ejemplos de hidrogeles termosensibles incluyen poli(N-isopropilacrilamida (PNIPAAm). Un tipo particular de este es quitosano.

20 Sin pretender imponer ninguna teoría, se cree que la red de quitosano dentro de las microperlas confiere propiedades mecánicas particulares a las perlas de tal manera que sean menos compresibles y más resistentes a la presión que las perlas hechas de alginato solamente. Las matrices de la presente invención proporcionan trabéculas de quitosano interconectadas dentro de un gel de alginato, dando lugar a un entorno que es favorable para el cultivo celular, proporcionando un medio acuoso con un pH neutro.

25 Estas trabéculas se obtienen con quitosano insoluble que forma coacervados que crean una red o trabéculas con estructura a modo de cesta cuando se mezcla con alginato. Las trabéculas son de grosor y longitud variable y proporcionan a las perlas propiedades biológicas y mecánicas particulares, tales como la estabilización del fenotipo, deformabilidad, elasticidad y módulo de compresión.

Ejemplos

Ejemplo 1. Preparación de perlas de alginato/quitosano

35 Las perlas se preparan a partir de una mezcla homogénea de quitosano (0,6 % final) y alginato (1,2 % final). Las dos soluciones se preparan por separado antes de mezclarse. Las soluciones de alginato y quitosano se preparan de la siguiente manera: una solución de alginato al 2,4 % (p/v) en NaOH 0,16 M y una solución de quitosano al 1,333 % (p/v) en AcH 1,666 M. A 10 volúmenes de la solución de alginato, se añade 1 volumen de una solución de Hepes (ácido 4-(2-hidroxietil)-1-piperazinetanosulfónico) 1M. Después de la homogeneización, se añaden progresivamente 9 volúmenes de solución de quitosano, mientras se mezcla con regularidad y vigorosamente. La solución de quitosano/alginato se pasa lentamente gota a gota a través de una aguja de calibre 25 y se añade a una solución de CaCl₂ 102 mM (Sigma-Aldrich, Bornem, Bélgica). Después de la gelificación instantánea, las perlas se dejan gelificar otros 10 min en esta solución de CaCl₂. A escala microscópica, el quitosano (teñido en rojo por la eosina) forma una estructura a modo de cesta, compuesta de trabéculas o fibras de diferente grosor y longitud (véase la figura 2 y 3). Los intersticios en la presente memoria están ocupados por alginato (hematoxilina teñida de violeta).

Ejemplo 2. Formulación de perlas en un hidrogel termosensible

50 Las perlas se mezclan con un hidrogel de quitosano vegetal (*Agaricus bisporus*) (Kitozyme, Alleur, Bélgica). Este paso se realiza a menos de 27 °C para evitar la gelificación del hidrogel. Se ha utilizado una relación cuentas/hidrogel de 3/1 (v/v).

Ejemplo 3. Implantación en un modelo animal

55 Un gel como se describe en el ejemplo 2 se ha implantado en un conejo con un lesión en el hueso subcondral y cartílago de la articulación. (Figura 4).

60 Después de 15 días de la implantación, el implante se evaluó (Figura 5). El implante sigue llenando la lesión. Las perlas y el hidrogel viscoso se mantienen constantes al menos dos semanas después de la inyección en la articulación lesionada, mientras se mantiene un perfil de seguridad.

65 Además se observa que el implante está colonizado con células procedentes de la médula ósea subyacente. Se encontraron células en el hidrogel termosensible de quitosano asentado (B), así como en las perlas de alginato de quitosano (C) (las trabéculas de quitosano se indican mediante D). Esta prueba confirma que el implante bifásico puede ser manejado y se injerta fácilmente. La naturaleza biodegradable del implante garantiza una resorción

progresivamente después de la implantación.

Ejemplo 4. Efecto del peso molecular de quitosano en la formación de perlas

- 5 En el procedimiento según la invención se han utilizado diferentes pesos moleculares de quitosano nativo. Se midieron diferentes parámetros físicos tales como el pH y la viscosidad de la solución mezclada (con condrocitos). La osmolaridad del hidrogel resultante se midió de acuerdo con una técnica bien conocida en la técnica.

Tabla 1

| Soluciones | pH | Viscosidad (cps) | Osmolaridad (mOsm/kg) |
|--|----------------------|------------------|-----------------------|
| Alginato 1,2 %/quitosano 22 kDa 0,6 % | 7,8 | 110,7 | 324 |
| Alginato 1,2 %/quitosano 30 kDa 0,6 % | 8,3 | 230 | 305 |
| Alginato 1,2 %/quitosano 32 kDa 0,6 % | 7,8 | 192 | 308 |
| Alginato 1,2 %/quitosano 55 kDa 0,6 % | 8,0 | 279 | 290 |
| Alginato 1,2 %/quitosano 55 kDa 0,6 % | 8,2 | 336 | 302 |
| Alginato 1,2 %/quitosano 91 kDa 0,6 % | Imposible de mezclar | | |
| Alginato 1,2 %/quitosano 146 kDa 0,6 % | Imposible de mezclar | | |

- 10 Llegamos a la conclusión de que las perlas mixtas se pueden fabricar con quitosano nativo de menos de 55 kDa. Por ejemplo, con quitosano de 91 kDa no se pueden fabricar perlas usando el proceso descrito en nuestra invención y con una relación de 1,2 % de alginato y 0,6 % de quitosano, la disolución de quitosano es demasiado viscosa. Por lo tanto, la selección del peso molecular del quitosano es un elemento esencial en nuestra invención.

- 15 **Ejemplo 5:** Un método de suplementación para el tratamiento de una articulación de un sujeto humano o un animal con una aguja.

- 20 Se ha utilizado una aguja para aplicar el suplemento intraarticular. Para la administración intraarticular, el suplemento se aplica en la cavidad sinovial a una densidad de 1.000 a 20.000 perlas de 0,1 a 0,5 µm por ml en un volumen de aproximadamente 1-2 ml por inyección. Por ejemplo, se inyecta 1 ml de líquido fisiológico que contiene 10.000 perlas de 0,2 µm en una articulación de la rodilla usando una aguja fina (por ej. de calibre 14 a 22, preferiblemente de calibre 18 a 22).

- 25 **Ejemplo 6:** Un método de suplementación para el tratamiento de una articulación de un sujeto humano o un animal con un trocar.

- 30 Se ha utilizado un trocar para aplicar el suplemento en un defecto articular pequeño o medio (menos de 1 cm²). Para la implantación, se aplica un suplemento en el cartílago a través del trocar a una densidad de 5 a 50 perlas de 1 a 5 mm de diámetro. Por ejemplo, se implantan 4 perlas de 1 mm de diámetro en una lesión traumática del cartílago de 0,5 cm de diámetro y una profundidad de 1 mm de diámetro.

REIVINDICACIONES

1. Un método para producir un hidrogel para suplemento intraarticular que comprende las etapas de:
- 5 - proporcionar una solución de alginato,
 - proporcionar una solución de quitosano que tiene un Pm inferior a 60 kDa,
 - mezclar la solución de alginato y la solución de quitosano, en donde la solución mezclada comprende entre el 0,5 y el 0,7 % (p/v) de quitosano y entre el 1 y el 1,4 % de alginato,
 - introducir gotitas de la solución mezclada en una solución con iones Ca^{2+} o Sr^{2+}
- 10 - aislar las perlas gelificadas de la solución con cationes.
2. El método de acuerdo con la reivindicación 1, en el que dicha solución mezclada comprende el 0,6 % de quitosano.
- 15 3. El método de acuerdo con las reivindicaciones 1 o 2, en el que dicha solución mezclada comprende el 1,2 % de alginato.
4. El método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en el que el alginato y el quitosano en dicha solución mezclada están presentes en una relación de entre 1,75 y 2,25.
- 20 5. El método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en el que dicho quitosano tiene un Pm de entre 35 y 45 kDa.
6. El método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en el que dichas gotitas se hacen pasar a través de una aguja para obtener una perla con un diámetro entre 0,01 y 5 mm.
- 25 7. El método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en el que el quitosano es de origen animal o vegetal.
- 30 8. Una perla esférica de hidrogel con un diámetro entre 0,01 y 5 mm, que comprende una mezcla homogénea de alginato y quitosano de Pm inferior a 60 kDa, **caracterizada por que** dicha perla comprende entre el 1 y el 1,4 % de alginato y entre el 0,5 y el 0,7 % de quitosano.
- 35 9. La perla de acuerdo con la reivindicación 8, en la que dicha perla comprende el 1,2 % de alginato.
10. La perla de acuerdo con las reivindicaciones 8 o 9, en la que dicha perla comprende el 0,6 % de quitosano.
11. La perla de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 8 a 10, en la que el quitosano tiene un Pm entre 35 y 45 kDa.
- 40 12. La perla de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 8 a 11, para su uso en la administración de suplementación intraarticular.
13. Un suplemento intraarticular que comprende perlas esféricas de hidrogel de acuerdo con la reivindicación 8.
- 45 14. Un suplemento intraarticular de acuerdo con la reivindicación 13 que comprende además un gel termogelificante viscoso.
15. Un suplemento intraarticular de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 13 a 14, en el que el quitosano es de origen animal o vegetal.
- 50 16. Un suplemento intraarticular de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 13 a 15, que comprende además un componente seleccionado del grupo que consiste en fármacos anti-inflamatorios no esteroideos, anestésicos, analgésicos opioides, corticosteroides, antineoplásicos, anticuerpos monoclonales, anticuerpos monoclonales quiméricos, vitaminas, minerales, nutracéuticos.
- 55 17. Un dispositivo de suplementación que contiene las perlas de hidrogel de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 8 a 11.

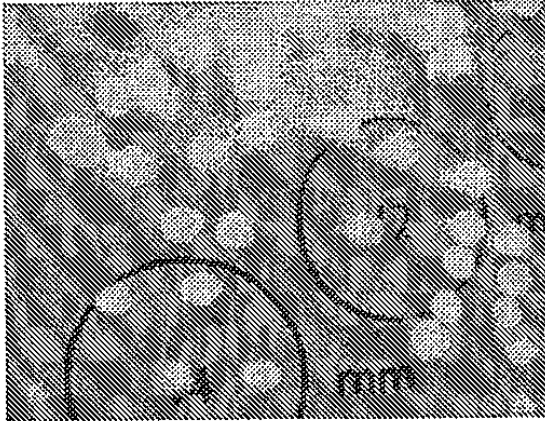


Figura 1

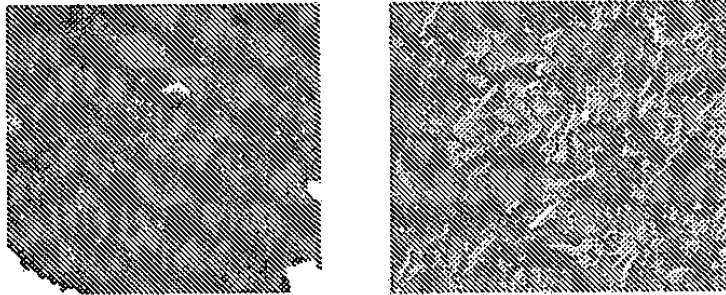


Figura 2

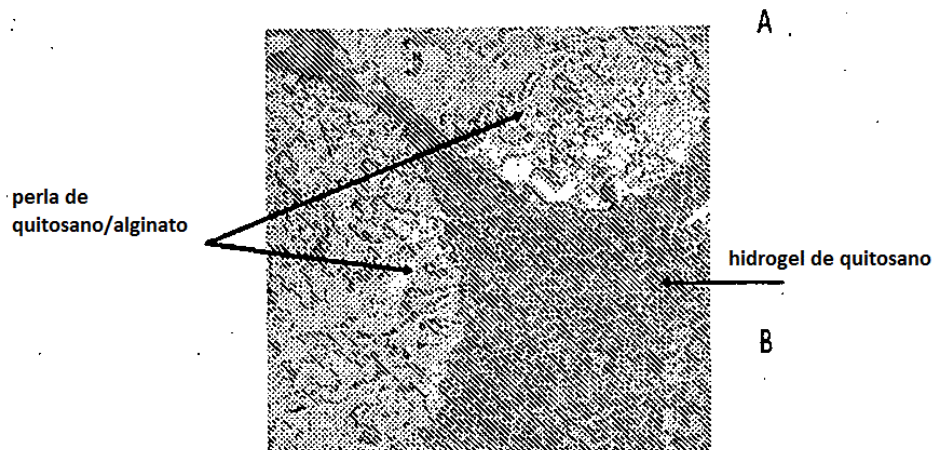


Figura 3

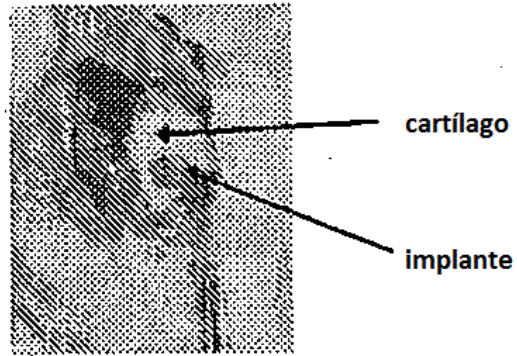


Figura 4

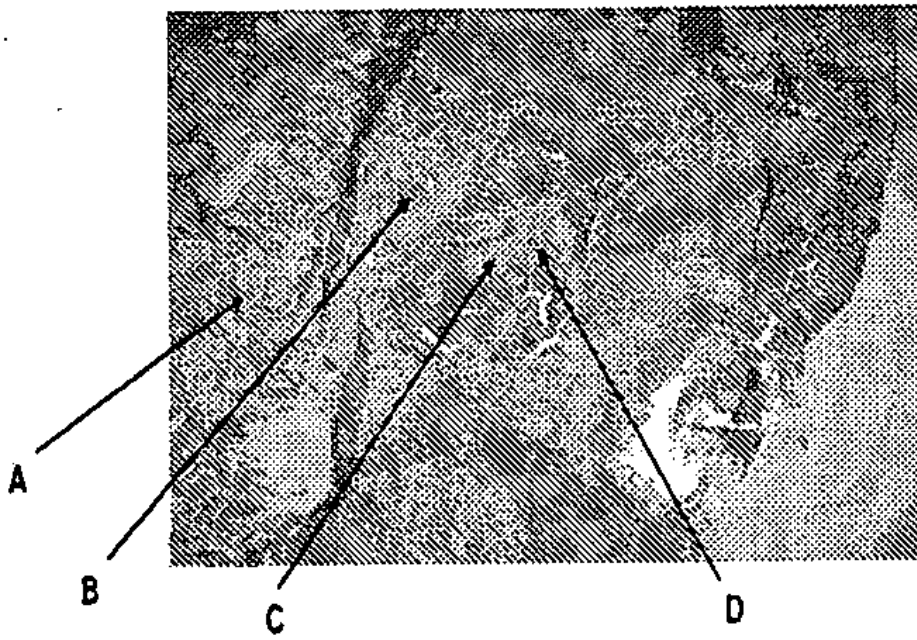


Figura 5