(19) OFICINA ESPAÑOLA DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

(11) Número de publicación: **2 552 651**

(51) Int. Cl.:

A61K 31/711 (2006.01)
A61K 31/713 (2006.01)
A61P 19/02 (2006.01)

(12) TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA T3

(96) Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **28.10.2009** **E 09764046 (0)**

(97) Fecha y número de publicación de la concesión europea: **09.09.2015** **EP 2358373**

(54) Título: **Composición inyectable de polidesoxirribonucleótido para el tratamiento de enfermedades osteoarticulares**

(30) Prioridad:

30.10.2008 IT TO20080804

(45) Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
01.12.2015

(73) Titular/es:

MASTELLI S.R.L. (100.0%)
Via Bussana Vecchia 32
18038 Sanremo (IM), IT

(72) Inventor/es:

CATTARINI MASTELLI, LAURA y
CATTARINI MASTELLI, GIULIA

(74) Agente/Representante:

LINAGE GONZÁLEZ, Rafael

ES 2 552 651 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 inyectable de polidesoxirribonucleótido para el tratamiento de enfermedades osteoarticulares

Esta invención se refiere a un nuevo uso de una composición que contiene polidesoxirribonucleótidos (en lo sucesivo en el presente documento PDRN).

La composición usada según la invención comprende una fracción de cadenas de polímero de PDRN de diferente peso molecular, obtenido de fuentes naturales, de origen animal o vegetal, tales como la placenta y el esperma de peces o plantas.

Se conocen composiciones a base de PDRN tal como se definieron anteriormente y están disponibles comercialmente.

El documento FR 2676926 describe composiciones farmacéuticas que contienen polidesoxirribonucleótidos altamente polimerizados obtenidos del esperma de peces y usados para el tratamiento o la prevención de déficits inmunitarios; se describen composiciones que contienen polidesoxirribonucleótidos en un disolvente no iónico que pueden usarse por vía parenteral, particularmente por vía intramuscular y/o por vía intravenosa.

En el documento EP 0226254 se describen procedimientos para la preparación de polidesoxirribonucleótidos obtenidos de placentas de mamíferos.

Esta invención se refiere a composiciones de PDRN extraídos de fuentes naturales para su uso en el tratamiento terapéutico y/o como coadyuvante terapéutico en el tratamiento de enfermedades osteoarticulares, en particular osteoartritis, administradas dentro de la articulación.

Otro objeto de la invención es el uso de una composición de PDRN para la producción de un dispositivo médico útil en el tratamiento coadyuvante de enfermedades degenerativas de las articulaciones.

En el contexto de la invención se usan formulaciones inyectables intraarticulares que contienen una fracción de PDRN altamente purificada, preferiblemente de una pureza mayor del 95% y más preferiblemente mayor del 98%, preferiblemente obtenida de esperma de peces.

Los PDRN usados tienen un peso molecular de entre 20 kDalton y 2500 kDalton, más preferiblemente entre 70 kDalton y 240 kDalton.

Normalmente, en las formulaciones usadas la fracción de PDRN está presente en una concentración de desde el 0,1% hasta el 10% en peso, preferiblemente de desde el 0,5% hasta el 3% en peso en disolvente salino acuoso, refiriéndose dicho peso al peso total de la formulación.

El disolvente salino acuoso contiene preferiblemente cloruro de sodio y una mezcla de dihidrogenofosfato de sodio e hidrogenofosfato de sodio.

Los PDRN usados pueden obtenerse de una fuente animal o vegetal que es rica en ADN usando los procedimientos descritos en la bibliografía mencionada anteriormente; prefiriéndose la elección de esperma de peces. A modo de ejemplo, un PDRN que puede usarse en el contexto de la invención puede obtenerse por un procedimiento que comprende las etapas de:

1) lisis enzimática de la matriz orgánica proteica

2) filtración clarificante de la disolución resultante

3) precipitación con sales de amonio cuaternario

4) descomplejación del precipitado

5) selección molecular usando cromatografía en columna

6) precipitación del eluato usando alcohol

En particular, se proporciona un producto inyectable, fármaco o dispositivo médico según la invención en forma de un vial o frasco o en forma de una jeringa precargada que contiene una cantidad medida de PDRN, por ejemplo de desde 1 ml hasta 4 ml (preferiblemente 2 ml) de disolución de PDRN en una concentración de desde 1 mg/ml hasta 100 mg/ml (preferiblemente 5-30, y en particular aproximadamente 20 mg/ml) con un pH de desde 6,5 hasta 7,5 y que tiene una consistencia viscosa con función humectante, lubricante y trófica.

Una composición según la invención, denominada a continuación en el presente documento CONDROTIDE, tiene las siguientes características:

- Aspecto: disolución transparente

- Color: incolora

- pH 6,5-7,5

- Volumen que puede ser extraído de la jeringa: 2,00-2,05 ml

- Osmolaridad: 270-330 mOs/kg

- Identificación UV de PDRN: absorción máxima a 258 t 2 nm

- Medición UV de PDRN: 18-22 mg/ml

- Esterilidad: estéril (esterilización realizada a T > 100, normalmente 120-121ºC durante tiempos de preferiblemente 15 minutos)

- Endotoxina bacteriana: ≤ 70 EU/ml

El nuevo uso de la composición de PDRN al que se refiere la invención se basa en las siguientes observaciones experimentales.

Investigaciones farmacológicas experimentales *in vitro* realizadas cuando se desarrollaba la invención han mostrado que las moléculas PDRN presentes en la composición según la invención tienen una importante acción trófica sobre cultivos primarios de células sinoviales, condrocitos y biopsias cartilaginosas, concordando esta observación con la observación clínica de que los resultados de la actividad de dichas composiciones (CONDROTIDE) pueden mejorar y mantenerse a lo largo del tiempo, a diferencia de los resultados producidos por el ácido hialurónico.

En particular se ha mostrado (a través de análisis de citofluorimetría y tinción específica) que la producción de matriz extracelular (colágeno tipo II y agrecano) se induce fuertemente en cultivos celulares mantenidos en un medio complementado con el 0,01% de CONDROTIDE durante dos semanas; cultivos control mantenidos en un medio complementado con el 1% de ácido hialurónico mostraron una producción de matriz celular significativamente menor.

También se han llevado a cabo análisis histológicos de biopsias cartilaginosas mantenidas en cultivo durante tres semanas usando un medio convencional con ácido hialurónico (1%) o CONDROTIDE (0,01%) añadido. El examen histológico mostró de nuevo una mayor producción de matriz extracelular en muestras tratadas con CONDROTIDE en comparación con aquellas a las que se les había añadido ácido hialurónico.

En particular, lo que se notifica anteriormente es el resultado de los siguientes experimentos.

Experimento 1: Biopsias cartilaginosas

La investigación se llevó a cabo para evaluar los efectos de CONDROTIDE (formulación indicada anteriormente) y ácido hialurónico sobre fragmentos de tejido cartilaginoso *ex vivo* (durante tres semanas), comparándolos con los de una disolución convencional usada normalmente en el laboratorio para el mantenimiento de biopsias cartilaginosas.

Muestra: biopsias cartilaginosas obtenidas de cirugía

Grupos experimentales:

1. PN: biopsias mantenidas en medio “cartilaginoso” + el 0,01% de CONDROTIDE,

2. HA: biopsias mantenidas en medio “cartilaginoso” + el 1% de ácido hialurónico,

3. CT: biopsias mantenidas en medio “cartilaginoso” sin complementos.

Criterio de valoración: Análisis histológico.

Resultados

Los resultados del análisis histológico de las biopsias se ilustran en las figuras 1 a 3, que se refieren a secciones de hematoxilina-eosina obtenidas de biopsias cartilaginosas fijadas en formalina e impregnadas en parafina, donde:

- Figura 1: una biopsia para el grupo control (CT): se observarán un fragmento descalcificado de cartílago articular, una matriz cartilaginosa normal ligeramente eosinófila y un agrupamiento celular sumergido en la matriz del cartílago,

- Figura 2: biopsia para el grupo HA: se observarán un fragmento descalcificado de cartílago, la presencia de tejido similar a hueso y la ausencia de matriz cartilaginosa normal,

- Figura 3: biopsias después de tres semanas para el grupo PN: se observarán un fragmento descalcificado de cartílago, una matriz cartilaginosa ligeramente eosinófila y una matriz cartilaginosa normal que rodea los condrocitos.

El análisis histológico para el grupo PN también indica una situación que es casi idéntica a la del control positivo CT, es decir se mantienen las características fenotípicas específicas del cartílago articular hialino. A la inversa, el grupo tratado con HA desarrolló características anómalas, tales como la formación de elementos óseos inmaduros y ausencia de una matriz extracelular normal.

Experimento 2: Células cartilaginosas aisladas (condrocitos)

La investigación se llevó a cabo para evaluar los efectos de la formulación según la invención (CONDROTIDE) y ácido hialurónico sobre condrocitos (cultivo de dos semanas), comparándolos con los de un medio convencional usado normalmente en laboratorio en el cultivo de condrocitos.

Muestra: Condrocitos humanos aislados.

Grupos experimentales:

4. PN: células mantenidas en medio “cartilaginoso” + el 0,01% de CONDROTIDE.

5. HA: células mantenidas en medio “cartilaginoso” + el 1% de ácido hialurónico,

6. CT: células mantenidas en medio “cartilaginoso” sin complemento.

Criterio de valoración: Inmunohistoquímica, análisis de FACS, tinción con azul alcián

Resultados

Las figuras 4 y 6 ilustran los resultados de la tinción con azul alcián (que puede revelar la presencia de matriz extracelular):

- Figura 4: grupo control: matriz altamente expresada,

- Figura 5: Grupo HA: matriz débilmente expresada,

- Figura 6: Grupo PN: matriz altamente expresada.

Se concluye que el 0,01% de CONDROTIDE puede inducir la producción de matriz extracelular en cantidades que son mucho mayores que el ácido hialurónico en cultivos de condrocitos aislados.

Estos datos se han confirmado por un análisis de FACS y un análisis inmunohistoquímico que ha demostrado que el perfil de la expresión y producción de agrecano y colágeno tipo II es significativamente menor en el grupo HA en comparación con los grupos PN y CT.

Los resultados de la investigación *in vitro* preliminar apoyan la observación de que el ácido hialurónico es únicamente útil para mejorar los síntomas durante un corto periodo de tiempo, mientras que la formulación según la invención (CONDROTIDE) ha demostrado que es mucho más activa en el tratamiento de enfermedades articulares, con resultados duraderos.

En apoyo de las pruebas *in vitro* mencionadas anteriormente, se realizó un experimento para comprobar los efectos de la formulación según la invención administrada por vía intraarticular a pacientes que padecen osteoartritis de la rodilla, con el objetivo específico de evaluar la eficacia, seguridad y tolerancia para esa formulación (CONDROTIDE, dispositivo médico de clase III)

La investigación se llevó a cabo según las directrices de la Declaración de Helsinki de 1974 y posteriores actualizaciones y los principios generales de “ICH Harmonized Tripartite Guidelines for Good Clinical Practice (GCP)” Antes de comenzar se obtuvo la aprobación de la investigación del Comité de Bioética de la Fondazione IRCCS Policlinico San Matteo de la Universidad de Pavía. Se informó a todos los pacientes sobre el ensayo clínico y el

investigador obtuvo el consentimiento informado por escrito de todos los pacientes antes de su inclusión.

El diseño de la investigación y el ensayo clínico controlado frente a ácido hialurónico era doble ciego y aleatorizado en grupos paralelos.

Cada paciente se asignó aleatoriamente a uno de los siguientes grupos de tratamiento:

- Grupo A: PDRN (formulación CONDROTIDE mencionada anteriormente),

- Grupo B: ácido hialurónico (SINOVIAL).

Se realizó un seguimiento de cada paciente durante un periodo de dieciséis semanas. Debido a que las dos preparaciones diferentes podían identificarse por el operario en el proceso de instilación, se usó la técnica del observador ciego para mantener condiciones doble ciego. El investigador que administró el producto era diferente del investigador que examinó al paciente clínicamente y evaluó la eficacia y seguridad del producto. De este modo, ni el paciente ni el investigador eran conscientes de la naturaleza del tratamiento.

Tamaño de muestra

El cálculo del tamaño de muestra se basó en una prueba de la t desapareada con un nivel de probabilidad del 5%, una desviación estándar de 3 cm y un poder deseado del 80% de detectar una diferencia de 1,6 cm en la reducción del dolor medido a través de EVA (Rheumatology 2002; 41:1240-1248). Se calculó un tamaño total de muestra de 56 pacientes y, por tanto, se dispuso la inclusión de al menos 60 pacientes, 30 por grupo.

Pacientes

Se reclutaron pacientes que padecían osteoartritis de la rodilla (según la clasificación de ACR - Arthritis Rheum. 1986; 29(8):1039-49) En particular, el producto usado en la investigación tenía la siguiente composición:

- Polidesoxirribonucleótidos: 20 mg

- Cloruro de sodio: 4 mg

- Dihidrogenofosfato de sodio dihidratado: 0,2 mg

- Hidrogenofosfato de sodio dodecahidratado: 1 mg

- agua para preparaciones inyectables: c.s. hasta 1 ml

Se usó como producto control una disolución de ácido hialurónico con el nombre comercial SINOVIAL, que contiene la sal de sodio altamente purificada de ácido hialurónico que tiene un peso molecular de entre 800 kDalton y 1200 kDalton.

Composición: Sal de sodio de ácido hialurónico: 0,8%, cloruro de sodio, fosfato de sodio y agua para preparaciones inyectables USP (c.s.)

Forma farmacéutica: Jeringa precargada con 16,0 mg de ácido hialurónico en 2 ml de solución salina de cloruro de sodio salino tamponada.

Dosificación y método de administración del tratamiento

El tratamiento intraarticular con gel de PDRN comprendió cinco instilaciones de 2 ml semanalmente.

El grupo control con ácido hialurónico se trató con instilaciones intraarticulares de hialuronato de sodio (16,0 mg de ácido hialurónico en 2 ml). Esta disolución también se aplicó como cinco instilaciones semanalmente.

El producto (CONDROTIDE o SINOVIAL) se inyectó en la cavidad articular de la rodilla afectada usando una aguja estéril.

Duración del tratamiento

El tratamiento se administró con una instilación por semana en la rodilla afectada para un total de cinco instilaciones; el tiempo de tratamiento fue por tanto de cuatro semanas, pero se realizó el seguimiento de cada paciente durante un total de dieciséis semanas.

Evaluaciones clínicas

Se realizaron las evaluaciones clínicas de cada paciente al inicio de la investigación (T0), y en las semanas uno (T1), dos (T2), tres (T3) y cuatro (T4) después del inicio de la investigación. T4 corresponde al final de la fase de tratamiento. Se realizaron evaluaciones clínicas de seguimiento un mes después del final del tratamiento (T8) y tres meses después del final del tratamiento (T16).

El parámetro de evaluación principal (criterio de valoración primario) era el nivel de dolor evaluado en reposo, con carga y con actividad física. Se usó una escala visual analógica (EVA en cm de desde 0 hasta 10) para evaluar el dolor. También se evaluaron la crepitación al moverse, la restricción de la movilidad articular y el edema articular, registrados con una puntuación de desde 0 hasta 3 (0 = ausente, 1 = leve, 2 = moderado, 3 = grave) en cada examen.

También se recopiló un cuestionario de autovaloración por los pacientes, Knee and Osteoarthritis Outcome Score, KOOS. KOOS es una escala para evaluar el grado de osteoartritis desarrollado como una extensión del índice de osteoartritis WOMAC (Western Ontario and MacMaster University) para generar una herramienta útil y universalmente aceptada para determinar la eficacia de tratamientos en ensayos clínicos.

El cuestionario es una herramienta específica para evaluar las opiniones de los pacientes acerca de sus rodillas. El cuestionario comprende cinco subescalas (dolor, figura 7), otros síntomas (figura 8), función articular en la vida diaria (ADL, figura 9), función articular en deportes/actividades recreativas (deporte/rec, figura 10) y calidad de vida (QOL, figura 11).

Se recopilaron los cuestionarios KOOS por los pacientes en el momento de los siguientes exámenes, T0, T4, T8 y T16, considerando la semana que precedía al examen en sus respuestas a las preguntas. Se proporcionaron cinco opciones de respuesta en el cuestionario KOOS, obteniendo cada respuesta una puntuación de entre 0 y 4.

Basándose en el análisis estadístico de los datos, los polinucleótidos demostraron tener un efecto mayor estadísticamente significativo sobre el dolor en reposo, el dolor con carga, la crepitación y la reducción del edema y la movilidad articular restringida que el control con ácido hialurónico.

Estos datos muestran el efecto mejor estadísticamente significativo de PDRN en comparación con ácido hialurónico.

En lo que respecta a los datos que se refieren al dolor en reposo, analizando las diferencias entre los valores básicos y su cambio en el transcurso del tratamiento (Delta), se obtuvieron los datos ilustrados a continuación e indican una tendencia global obvia por parte de los PDRN a alcanzar valores finales que son mejores que los obtenidos en pacientes tratados con ácido hialurónico.

Los resultados se ilustran en la figura 12, en donde la línea vertical discontinua en el gráfico divide cada diagrama en dos partes, que corresponden al periodo de tratamiento (mitad de la izquierda) y el periodo de seguimiento (mitad de la derecha).

En el transcurso de la investigación, se permitió a los pacientes el uso de antiinflamatorios no esteroideos (AINE) si era necesario para reducir síntomas de dolor. Los datos registrados referentes al uso de AINE (véase el diagrama en la figura 13) muestran un mayor consumo obvio al comienzo del ensayo clínico (T0) en el grupo de pacientes tratados en comparación con los controles, produciendo una diferencia estadísticamente significativa porque había una reducción en el uso de estos fármacos en el grupo tratado que no se observó en el grupo control.

Además de esto, a medida que progresaba el tratamiento, había una reducción rápida y marcada en el consumo de AINE en el grupo tratado con PDRN después de sólo una instilación intraarticular (T1). Además de esto había un uso menor continuado de AINE en el grupo de PDRN en todos los tiempos posteriores, con una diferencia particular entre los dos tratamientos a T4 y T8.

Tal como se observará a partir de los datos en las figuras 7 hasta 11, durante el periodo de tratamiento los productos sometidos a prueba provocaron una mejora en todos los indicadores de KOOS; esta mejora fue ligeramente más rápida en el grupo control. Sin embargo, si se observa la forma de los gráficos en el periodo de seguimiento, se observará que la puntuación para el grupo de ácido hialurónico disminuye o permanece constante, mientras que la puntuación para el grupo de PDRN continúa aumentando.

Tres meses después del final del tratamiento (T16) las puntuaciones para el grupo de PDRN eran en todos los casos superiores a las del grupo de ácido hialurónico; la diferencia es particularmente obvia para los síntomas y las subescalas deporte/rec.

En la última escala, que representa la función articular durante y después de la actividad motora, el grupo control (ácido hialurónico) experimentó reversión hasta casi los valores iniciales, mientras que el grupo tratado con PDRN mostró una mejora global de 14,55 puntos (no se olvidará que una mejora en la escala KOOS es clínicamente significativa si la puntuación aumenta en 8-10 puntos en el transcurso del tratamiento).

Los datos obtenidos apoyan el uso de la formulación según la invención en el tratamiento terapéutico y como coadyuvante terapéutico en el tratamiento de enfermedades degenerativas de las articulaciones, tales como en particular la osteoartritis.

Actualmente no hay tratamiento definitivamente eficaz para estas enfermedades; los tratamientos propuestos incluyen antiinflamatorios, analgésicos, esteroides, fisioterapia y cirugía, así como complementación de la viscosidad del líquido sinovial a través de la instilación intraarticular de ácido hialurónico, usado en las pruebas de control descritas anteriormente.

Debe tenerse en cuenta que el mejor efecto revelado por la formulación de PDRN incluida en la formulación según la invención se debe al hecho de que los PDRN pueden unir una cantidad apreciable de agua y reorganizar su propia estructura, orientando y coordinando los módulos de agua, de modo que se forma un gel apropiado.

El dispositivo según la invención, inyectado por vía intraarticular, proporciona un complemento viscoelástico para el líquido sinovial y puede lubricar exhaustivamente las superficies articulares. Además de esto, puede suponerse que las micromoléculas de polidesoxirribonucleótidos se someten al mismo tiempo a la acción de enzimas líticas que liberan progresivamente PDRN de tamaño progresivamente más pequeño en la cavidad articular.

La instilación intraarticular usando la formulacion según la invención enriquece progresivamente el líquido sinovial, inicialmente con macromoléculas de polinucleótido que tienen una acción viscoelástica y a lo largo del tiempo con polinucleótidos y nucleótidos que se usan por los tejidos para mejorar la actividad celular y para proteger y promover los mecanismos fisiológicos de regeneración del cartílago articular.

Por tanto, la acción viscoelástica y lubricante del producto se combina con un efecto bioestimulante y trófico sobre el cartílago articular.

Se concluye a partir de esto que la formulación según la invención es de uso general para el tratamiento de enfermedades articulares dolorosas que pueden atribuirse a estados degenerativos o postraumáticos o cambios en las articulaciones.

REIVINDICACIONES

1. Composición a base de polidesoxirribonucleótidos, extraídos de fuentes naturales, para su uso mediante administración intraarticular en el tratamiento terapéutico y/o como coadyuvante terapéutico en el tratamiento de un estado degenerativo o postraumático de las articulaciones, en la que dichos polidesoxirribonucleótidos tienen pesos moleculares de entre 70 kDalton y 240 kDalton.

2. Composición según la reivindicación 1, en forma de una disolución acuosa inyectable que contiene desde 1 hasta 100 mg/ml, preferiblemente desde 5 hasta 30 mg/ml de polidesoxirribonucleótidos en un disolvente acuoso salino.

3. Composición según las reivindicaciones 1 ó 2, para el tratamiento de la osteoartritis.

4. Composición según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, que comprende una fracción de polidesoxirribonucleótidos extraída de esperma de peces, teniendo dichos polidesoxirribonucleótidos cadenas de polímero con diferentes pesos moleculares de entre 70 kDalton y 240 kDalton.

5. Composición según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, que tiene un pH de desde 6,5 hasta 7,5.

6. Composición según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, que contiene sales de cloruro de sodio y fosfato de sodio.

7. Composición según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, para uso en el tratamiento del dolor en un paciente que padece un estado degenerativo o postraumático doloroso de las articulaciones.

8. Uso de una composición según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6 para preparar un producto farmacéutico o un dispositivo médico útil como coadyuvante terapéutico en el tratamiento de patologías osteoarticulares, particularmente osteoartritis mediante inyección intraarticular de dicha composición.

9. Uso de una composición según la reivindicación 8, en el que dicho producto farmacéutico o dispositivo médico para administración mediante inyección está en forma de un vial, un frasco para medicamentos o una ampolla o en forma de una jeringa precargada.

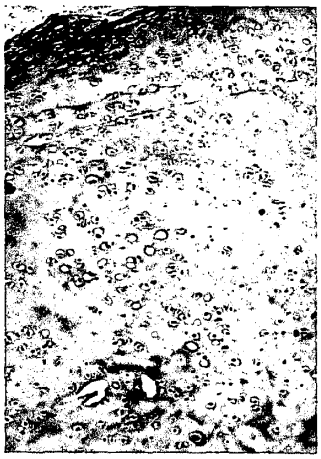


FIG.1 (CT)

FIG.2 (HA)

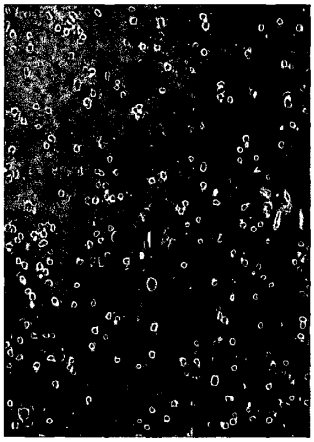


FIG.3 (PN)

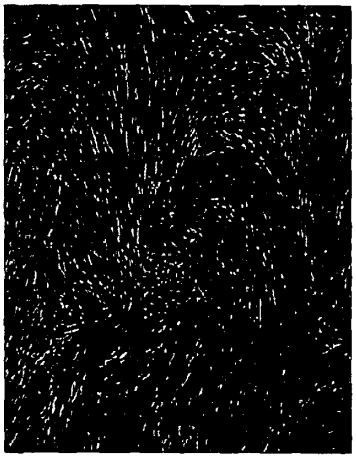


FIG.4

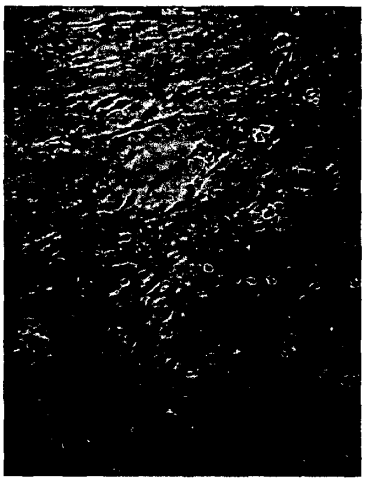


FIG.5

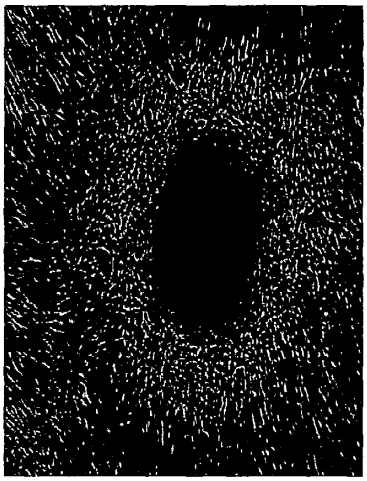


FIG.6

FIG.7

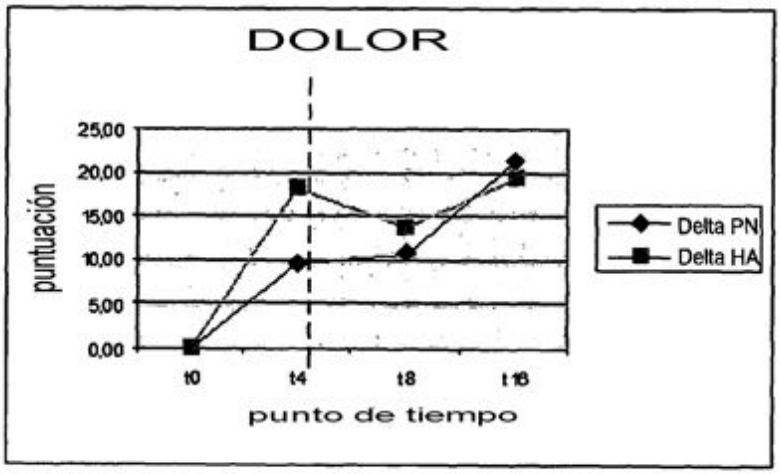


FIG.8

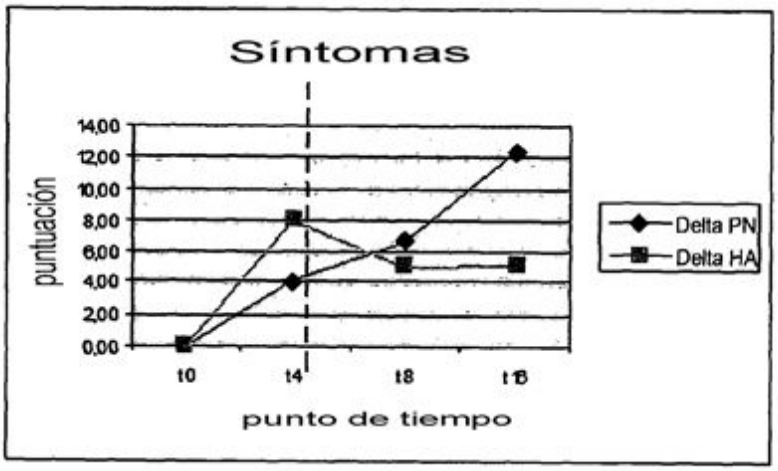


FIG.9

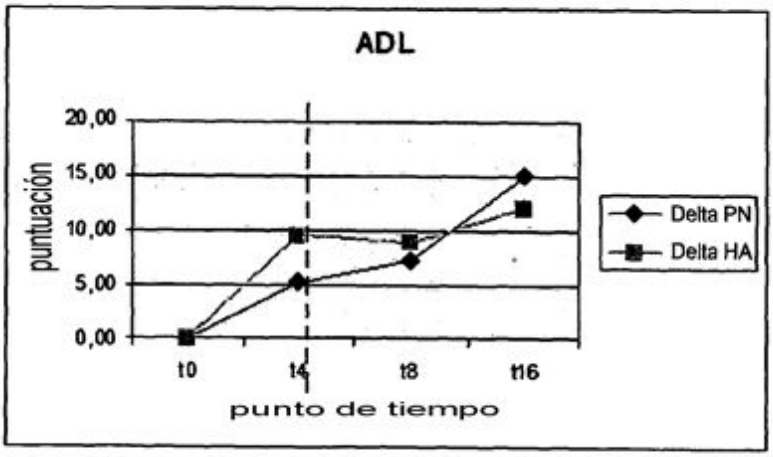


FIG.10

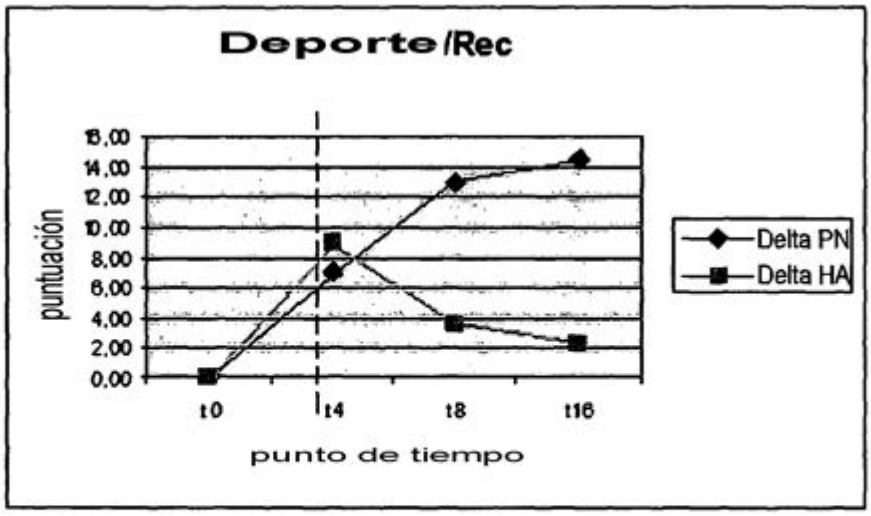


FIG.11

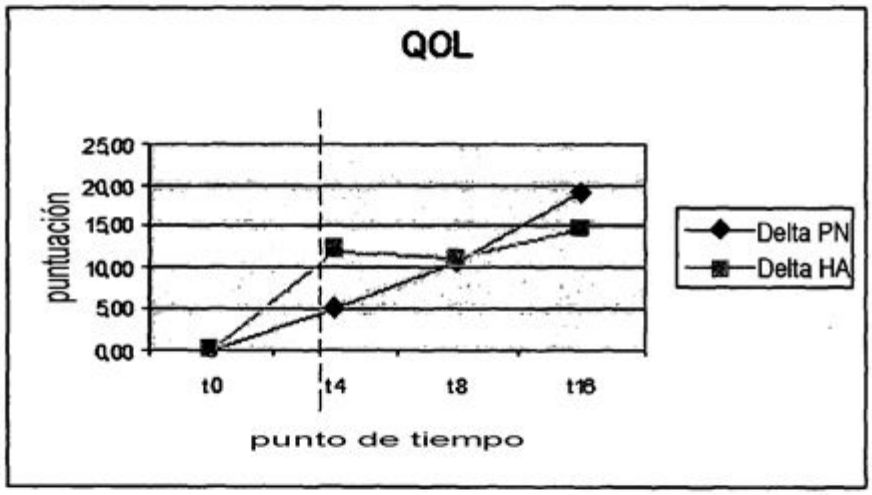
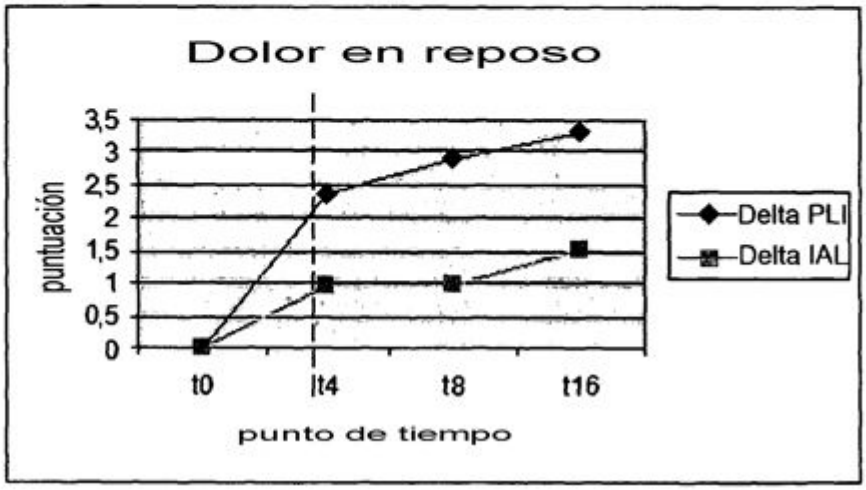


FIG.12



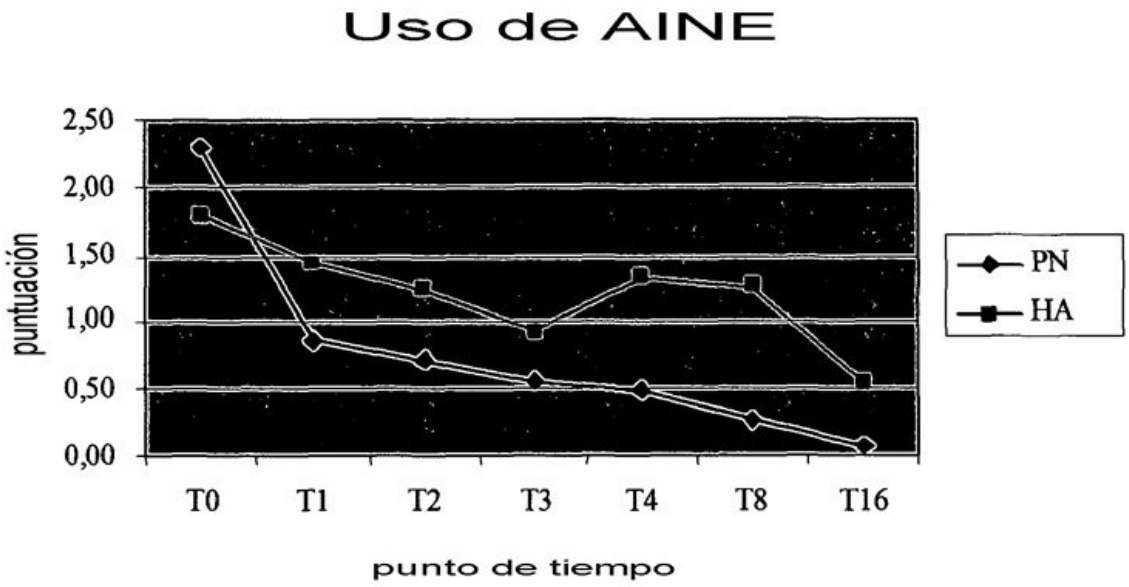

Uso de AINE
2,50
2,00
1,50
1,00
0,50
0,00
puntuación
T0
T1
T2
T3
T4
T8
T16
punto de tiempo
PN
HA

FIG.13