

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 599 630**

51 Int. Cl.:

A61L 27/50 (2006.01)

A61K 9/00 (2006.01)

A61K 9/127 (2006.01)

A61K 31/685 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **07.10.2007 PCT/IL2007/001215**

87 Fecha y número de publicación internacional: **03.04.2008 WO08038292**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **07.10.2007 E 07827189 (7)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **27.07.2016 EP 2079442**

54 Título: **Uso de glicerofosfolípidos para lubricación de las articulaciones**

30 Prioridad:

28.09.2006 US 847651 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
02.02.2017

73 Titular/es:

**HADASIT MEDICAL RESEARCH SERVICES &
DEVELOPMENT LIMITED (33.0%)
P.O.Box 12000 Kiryat Hadassah
91120 Jerusalem, IL;
TECHNION RESEARCH & DEVELOPMENT
FOUNDATION LTD. (33.0%) y
YISSUM RESEARCH DEVELOPMENT COMPANY,
OF THE HEBREW UNIVERSITY OF JERUSALEM
(33.0%)**

72 Inventor/es:

**BARENHOLZ, YECHEZKEL;
NITZAN, DORRIT;
ETSION, IZHAK;
SCHROEDER, AVI;
HALPERIN, GRIGORY y
SIVAN, SARIT**

74 Agente/Representante:

IZQUIERDO BLANCO, María Alicia

ES 2 599 630 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).

Uso de glicerofosfolípidos para lubricación de las articulaciones

Descripción

5 CAMPO DE LA INVENCION

[0001] Esta invención se refiere a liposomas y su uso terapéutico.

LISTA DE ANTECEDENTES

- 10 [0002] La siguiente es una lista de la técnica anterior, que se considera que sea pertinente para la descripción del estado de la técnica en el campo de la invención.
- 15 1. Hills. B. A. Phospholipid and propylene glycol based lubricant. Patente de EE.UU. 6.133.249. 1998.
 2. Hills. B. A. Lubricant Composition for Rheumatism. Patente de EE.UU. 5.403.592. 1990.
 3. Hills. B. A.; Monds. M. K.. Enzymatic identification of the load-bearing boundary lubricant in the joint. Br. J. Rheumatol. 1998. 37. (2). 137-142.
 - 20 4. Oloyede. A.. Gudimetla. P., Crawford. R.. Hills. B. A.. Biomechanical responses of normal and delipidized articular cartilage subjected to varying rates of loading. Connective Tissue Research 2004. 45. (2). 86-93.
 5. Ethell. M. T.; Hodgson. D. R.; Hills. B. A., The synovial response to exogenous phospholipid (synovial surfactant) injected into the equine radiocarpal joint compared with that to prilocaine. hyaluronan and propylene glycol. New Zealand Veterinary Jour- nal 1999. 47. (4). 128-132.
 - 25 6. Pickard. J. E.; Fisher. J.; Ingham. E.; Egan. J., Investigation into the effects of proteins and lipids on the frictional properties of articular cartilage. Biomaterials 1998. 19. (19). 1807-1812.
 - 30 7. Kawano. T.; Miura. H.; Mawatari. T.; Moro-Oka. T.; Nakanishi. Y.; Higaki. H.; Iwamoto. Y.. Mechanical effects of the intraarticular administration of high molecular weight hyaluronic acid plus phospholipid on synovial joint lubrication and prevention of articular cartilage degeneration in experimental osteoarthritis. Arthritis Rheum. 2003. 48. (7). 1923-1929.
 - 35 8. Forsey. R. W.; Fisher. J.; Thompson. J.; Stone. M. H.; Bell. C.; Ingham. E., The effect of hyaluronic acid and phospholipid based lubricants on friction within a human cartilage damage model. Biomaterials 2006. 27. (26). 4581-4590.
 - 40 9. Klein. J., Molecular mechanisms of synovial joint lubrication. J. Proc. Inst. Mech Eng.. Part J: J. Eng. Tribology 2006. 220. (8). 691-710.

45 [0003] Una lista completa de la técnica anterior, que se denomina en ocasiones en el texto a continuación, aparece en la parte final de la descripción antes de las reivindicaciones. Se hará referencia a las publicaciones mediante la indicación de su número de la lista completa de referencias.

ANTECEDENTES DE LA INVENCION

- 50 [0004] Disfunciones de la articulación afectan a una gran parte de la población. Biolubricación suficiente es un requisito previo para la movilidad adecuada de las articulaciones, que es crucial para la prevención y mejora de los cambios degenerativos de la articulación¹.
- [0005] Una disfunción de la articulación común es la osteoartritis (OA), con una prevalencia superior a 20 millones únicamente en los Estados Unidos². La etiología de la OA es multifactorial, incluyendo causas inflamatorias, metabólicas y mecánicas³⁻⁵. Entre la lista de factores de riesgo implicados son la edad, el sexo, la obesidad, la ocupación, el trauma, la enfermedad ateromatosa vascular e inmovilización^{1, 3-7}. OA puede surgir como resultado de la degradación del cartílago articular; o por el contrario, la esclerosis del hueso subcondral puede aparecer antes de la degeneración del cartílago y pérdida^{8, 9}. Una vez que el cartílago articular está lesionado, los daños progresan¹⁰.
- 60 [0006] El tratamiento actual se centra en la reducción de exceso de carga de las articulaciones, fisioterapia, y el alivio del dolor y la inflamación, por lo general mediante la administración sistémica o intra-articular de fármacos¹¹.
- [0007] El cartílago articular forma una superficie lisa, dura, elástica y flexible que facilita el movimiento de los huesos. El espacio sinovial se llena con el fluido sinovial altamente viscoso (SF), que contiene ácido hialurónico (HA) y la lubricina de glicoproteína¹²⁻¹⁴. HA es un polímero de ácido D-glucurónico y D-N-acetilglucosamina, que es altamente inestable y se degrada en las condiciones inflamatorias de OA^{15,16}. Lubricina se compone de ~44% de

proteínas, ~45% de carbohidratos y ~11% de fosfolípidos (PL)¹²⁻¹⁴, de las cuales ~41% son fosfatidilcolinas (PC), ~27% fosfatidiletanolaminas (PE) y ~32% esfingomielinas¹⁷⁻¹⁹. Estos PL se conocen como "fosfolípidos activos en superficies" (SAPL). El PE y PC de SAPL contienen dos cadenas de hidrocarburos, uno de los cuales es el ácido oleico monoinsaturado (18:1).

[0008] Lubricación de límite, en la que capas de moléculas de lubricación separan superficies opuestas, se produce bajo carga de articulaciones^{17, 18, 20}. Varias sustancias diferentes se han propuesto como los lubricantes de contorno nativos en el cartílago articular. En el pasado, el HA se pensaba que era el principal lubricante²¹, sin embargo, un estudio reciente indica que tribológico HA *"por sí mismo ... no es responsable de la biolubricación de frontera casi sin fricción que se encuentra en el cartílago articular"*, pero puede contribuir a la carga rodamiento y protección de desgaste²². Muchos informes han demostrado lubricina para desempeñar el papel principal en las propiedades lubricantes de fluido sinovial^{12, 14, 19, 20, 23, 24}. Pickard et al.²⁵ y Schwartz y Hills¹⁹ demostraron que los fosfolípidos definidos como los fosfolípidos de superficie activa (SAPL) de lubricina facilitan la lubricación de las articulaciones en el cartílago articular. Hills y compañeros de trabajo demostraron que las articulaciones OA tienen una deficiencia SAPL, y que la inyección del fosfolípido tensioactivo 1,2-dipalmitoil-sn-glicero-3-fosfolina (DPPC) en las articulaciones de pacientes con OA dio lugar a la mejora de movilidad de una duración de hasta 14 semanas²⁶ sin mayores efectos²⁷. En otro estudio, la utilización de una técnica de conservación de cartílago criogénico único, Watanabe et al. observaron vesículas lipídicas globulares en la superficie del cartílago sano, que se supone que desempeñan un papel importante en lubricación²⁸. Kawano et al.²⁹ y Forsey et al.³⁰, utilizando modelos animales, han demostrado que el uso de alto peso molecular HA (~2000 kDa) en combinación con capacidad de lubricante DPPC mejorado de este último.

[0009] La patente de EE.UU. 6,800,298 describen composiciones de hidrogel a base de dextrano que contienen lípidos, fosfolípidos, en especial para la lubricación de las articulaciones de mamíferos.

[0010] Recientemente, Klein y colaboradores resumieron diversos temas de lubricación de las articulaciones a nivel molecular. Señalan el papel potencial de las macromoléculas cargadas de tipo cepillo altamente hidratadas en la superficie del cartílago como principales contribuyentes a lubricación de cartílago³¹⁻³³.

[0011] Forsey, R. W. et al. ("The effect of hyaluronic acid and phospholipid based lubricants on friction within a human cartilage damage model". Biomaterials 2006, 27, (26), 4581-4590), Kawano, T. et al. ("Mechanical effects of the intraarticular administration of high molecular weight hyaluronic acid plus phospholipid on synovial joint lubrication and prevention of articular cartilage degeneration in experimental osteoarthritis". Arthritis Rheum. 2003, 48, (7), 1923-1929) y WO 03/000190 todos ejemplifican liposomas, que comprenden DPPC como el único lípido. El documento WO 2004/047792 describe formulaciones de liposomas que comprende glucocorticoides como fármacos para el tratamiento de enfermedades inflamatorias. Los liposomas se utilizan simplemente para la encapsulación o atrapamiento del componente activo de la farmacéutica. Los liposomas mismos no se utilizan para la lubricación de las articulaciones.

[0012] El documento WO 02/078445 describe formulaciones de atrapamiento de ingredientes activos y fármacos, tales como aminoazúcares, por inyección intra-articular. Los liposomas se utilizan como vehículos, no para lubricación de las articulaciones.

[0013] US 2006/029655 describe un método para atrapamiento eficiente de materiales activos en liposomas. Una vez más, los liposomas se utilizan simplemente como vehículos, no para la lubricación de las articulaciones.

RESUMEN DE LA INVENCION

[0014] La presente invención se basa en el descubrimiento de un sistema liposomal para lubricación de las articulaciones y en el estudio del efecto de diferentes composiciones PL, tamaño, y laminaridad en fricción de la junta, utilizando un aparato de cartílago-sobre-cartílago que imita articulaciones articulares.

[0015] Así, de acuerdo con la invención, una nueva formulación lubricante basada en un sistema de liposomas que comprende fosfolípidos (PL) se propone, para su introducción en las articulaciones sinoviales con el fin de mejorar o restaurar la movilidad de las articulaciones.

[0016] Así, de acuerdo con un primero de sus aspectos, se proporciona liposomas que consisten en una o más membranas con al menos un fosfolípido (PL) seleccionado del grupo que consiste en un glicerofosfolípido (GPL) que tiene dos, que son iguales o diferentes, cadena de hidrocarburo C₁₂-C₁₆ y una esfingomielina (SM) que tiene una cadena de hidrocarburo C₁₂-C₁₈, la una o más membranas que tienen una temperatura de transición de fase en la que sólido ordenado (SO) a transición de fase líquida desordenada (LD) ocurre, estando la temperatura de transición de fase dentro de una temperatura de 20°C a 39°C, para su uso en el tratamiento de la disfunción de la articulación por la lubricación de las articulaciones que tiene una temperatura conjunta que está por encima de la temperatura de transición de fase.

[0017] De acuerdo con un segundo de sus aspectos, se proporciona el uso de liposomas que consisten en una o

más membranas con al menos un fosfolípido (PL) seleccionado del grupo que consiste en glicerofosfolípido (GPL) que tiene dos, siendo iguales o diferentes, cadena de hidrocarburo C_{12} - C_{16} y una esfingomielina (SM) que tiene una cadena de hidrocarburo C_{12} - C_{18} , las una o más membranas que tienen una temperatura de transición de fase en la que sólido ordenado (SO) a fase de transición líquida desordenada (LD) se produce, siendo dentro de una temperatura de 20°C a 39°C la temperatura de transición de fase, para su uso en la preparación de una composición farmacéutica para el tratamiento de disfunciones de la articulación de las articulaciones que tienen una temperatura conjunta está por encima de dicha temperatura de transición de fase.

[0018] De acuerdo con una realización, el GPL comprende dos cadenas de acilo C_{14} o C_{16} .

[0019] Según otra realización, al menos una de dichas cadenas de hidrocarburo es una cadena de hidrocarburo saturada. Preferiblemente, las dos cadenas de hidrocarburos están saturadas.

[0020] De acuerdo con una realización adicional, la PL es una fosfatidilcolina (PC). Preferiblemente, dicho PC se selecciona de dimiristoilfosfatidilcolina (DMPC), 1, 2-dipalmitoil-sn- glicero-3-fosfolina (DPPC) y la combinación de los mismos.

[0021] De acuerdo con otra realización, los liposomas son vesículas multilameller (MLV). Preferiblemente los liposomas tienen un diámetro medio de entre aproximadamente 0,3 μ m a aproximadamente 5 μ m.

[0022] De acuerdo con todavía otra realización, el grupo de cabeza de la PL está complejoado con al menos 6 moléculas de agua por grupo de cabeza.

[0023] De acuerdo con una realización adicional de la temperatura conjunta es 1-15°C por encima de dicha transición de fase temperatura ambiente.

[0024] De acuerdo con otra realización, los liposomas se formulan para inyección intra-articular, administración artroscópica o para la administración quirúrgica.

[0025] De acuerdo con todavía otra realización, los liposomas son de uso para el tratamiento de un trastorno articular o de los síntomas derivados de los mismos. Preferiblemente, el trastorno articular se selecciona de artritis, pacientes con artritis reumatoide en osteoartritis, artrosis, lesión articular traumática, articulación bloqueada, lesiones deportivas, artrocentesis post estatus, la cirugía artroscópica, cirugía de la articulación abierta, y el reemplazo de la articulación.

[0026] La composición de liposomas de la invención se pueden administrar a una articulación afectada a través de la inyección intra-articular, la administración ortoscópica, administración quirúrgica y, en general, cualquier forma de administración que puede ser utilizada para infundir una formulación de este tipo en la membrana sinovial o conjunta en el cartílago de la articulación. Articulaciones afectadas tratables de acuerdo con la invención pueden estar asociadas con una variedad de condiciones, tales como la artritis, la artritis reumatoide, la osteoartritis (así como la osteoartritis en pacientes de artritis reumatoide), lesión articular traumática, lesión deportiva, articulación bloqueada (como en la articulación temporomandibular (ATM)), intervención post quirúrgica de estatus como la artrocentesis, la cirugía artroscópica, artroplastia, rodilla y prótesis de cadera. Una condición preferida para ser tratada o prevenida por la invención es osteoarthritis primaria o secundaria.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

[0027] Con el fin de entender la invención y para ver cómo se puede llevar a cabo en la práctica, ahora se describirán formas de realización, a modo de ejemplo no limitativo, con referencia a los dibujos adjuntos, en los que:

La **Figura 1** es un gráfico de barras que muestra los coeficientes de fricción (estáticos y dinámicos) obtenidos para varios medios de lubricación, incluyendo el líquido sinovial inflamado (ISF); tampón de histidina (HB, 5 mM), dispersiones que comprenden vesículas multilamelares (MLV, realizado en HB 5 mM, estando los lípidos en un rango de concentración de entre 35-140 mM) con el fosfolípido DMPC, MLV que comprende DMPC o DMPC-colesterol, o una mezcla de DMPC y ²⁰⁰⁰PEG-DSPE DMPC o una mezcla de DMPC y DPPC, o vesículas unilamelares pequeñas (SUV) que comprenden DMPC. Todas las mediciones se realizaron a 37°C bajo presión de contacto de 2,4 MPa (carga de 30N) y una velocidad de deslizamiento de 1 mm/s. La salina se utilizó como control.

La **Figura 2** muestran el efecto de los diversos lubricantes y medios en concentración total de fosfolípidos, en muestras de cartílago de individuos sanos después de haberse sometido a ensayos de fricción similares en la presencia de los diferentes lubricantes. Los controles no fueron sometidos a ensayos de fricción.

La **Figura 3** es una concentración de PC que muestra el gráfico como función de la profundidad vertical en cartílago donde especímenes de cartílago se sometieron a ensayos de fricción similares en la presencia de: DMPC-MLV (0,8-3,5 μ m de diámetro) 141 mM en 5 mM HB (■); DMPC-SUV (~100 nm de diámetro) 141 mM en 5

mM HB (▲); o HB solo 5 mM (x); cortada en discos y la prueba de su concentración DMPC como una función de la profundidad del cartílago.

Las **Figuras 4A-4F** son micrografías de escaneo de microscopio electrónico (SEM) de las muestras de cartílago en presencia y en ausencia de medios lubricantes y pruebas de fricción. Micrografías SEM de las muestras de control, en ausencia de prueba de fricción:

FIG. 4A es una micrografía de cartílago sano, mostrando su origen natural en las estructuras vesiculares lipídicas en la superficie (x3000); FIG. 4B es una micrografía del cartílago artrítico (x3000); y cartílago sano sometido a ensayos de fricción en presencia de los siguientes lubricantes: solución salina (x6000, Fig 4C); ISF (x800, Fig. 4D); DMPC- SUV (x800, Fig. 4E.); y DMPC-MLV (X6000 Fig. 4F).

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE ALGUNAS REALIZACIONES

[0028] La presente invención se basa en el resultado de una combinación de (i) la medición del coeficiente de fricción utilizando una configuración de cartílago en el cartílago humano (Merkher, Y. et al.40), (ii) estudios de cartílago morfológicos basados en SEM, (iii) determinaciones cuantitativas de cartílago fosfolípido y fosfatidilcolina (PC), y (iv) las características fisicoquímicas de diferentes liposomas basados en PC, lo que demuestra el potencial de vesículas multilamelares de gran tamaño (diámetro superior a 0,3 μm), como DMPC-MLV y de DMPC/DPPC-MLV (0,6/1,0 relación molar), dispersado en baja fuerza iónica HB, como lubricantes de cartílago eficaces y reductores de desgaste a temperatura ligeramente por encima (por ejemplo, aproximadamente 1°C, 2°C, 3°C, 5°C, 8°C, 11°C y, a veces hasta aproximadamente 15°C) de la temperatura de transición de fase-SO-a LD.

[0029] Inicialmente, la eficacia lubricante de los liposomas multilamelares compuestos de varios PCs, con dos cadenas de hidrocarburos de 14 a 22 carbonos, totalmente saturados o con diversos grados de insaturaciones, se comparó. Cadenas de hidrocarburos $\text{C}_{12}\text{-C}_{16}$, donde demostraron ser de una longitud preferida.

[0030] A continuación, utilizando el lubricante de componente único más eficaz, DMPC, los efectos del tamaño del liposoma, laminaridad, y de la incorporación ya sea de colesterol, ya sea de mPEG-DSPE o un PL adicional en las bicapas lipídicas de los liposomas de DMPC. Estos estudios demostraron que MLV, como DMPC-MLV o DMPC/DPPC-MLV (0,8-3,5 μm de diámetro), cuando se utilizan como lubricantes a una temperatura ligeramente por encima de la temperatura de transición de fase SO-a-LD, fueron los más efectivos. Esto fue confirmado por el desempeño de DMPC/DPPC-MLV a 37°C, que se encuentra ligeramente por encima del rango de SO a la temperatura de fase de transición LD, es decir, $T_m = \sim 34^\circ\text{C}$, en comparación con su desempeño a 24°C (fase SO).

[0031] Los resultados presentados en este documento a continuación muestran además los siguientes:

- DMPC, que fue identificado como uno de los componentes preferidos de la composición liposómica biolubricante (cuando se utiliza solo o en combinación con DPPC) tiene cadenas de acilo de longitud media (14 carbonos) saturadas, que tienen una T_m ligeramente inferior a la temperatura fisiológica ($T_m = 23,2^\circ\text{C}$ para DMPC-MLV y $T_m = \sim 34^\circ\text{C}$ durante DMPC/DPPC [0,6/1,0 mol/mol] de segunda mano), por lo tanto, ambas composiciones PL proporcionan liposomas que están en la fase líquida desordenada (LD) a 37°C, en la que su grupo de cabeza polar es altamente hidratada (~ 9.7 moléculas de agua por grupo de cabeza DMPC o DPPC, en comparación con $<4,3$ moléculas de agua por 10 grupo de cabeza cuando está por debajo de la T_m en la fase SO)⁵³;

- Los datos de compresibilidad adiabática presentados en el presente documento a continuación demuestran las diferencias entre PC en la fase sólida ordenada (SO) (valores bajos de K) y la fase LD (valores más altos K) y la superioridad de la fase de LD. Compresibilidad adiabática de bicapa lipídica parcial (K), que se correlaciona bien con el comportamiento termotrópico⁵⁴ y se encontró que reflejaba el nivel de hidratación, el estado físico y el volumen de cavidades (volumen libre) en la bicapa lipídica 45. Moléculas de agua unidas, que interactúan con el grupo de cabeza de PC, se sugiere que afectan al volumen total de las cavidades en la bicapa, lo que afecta a las interacciones intermoleculares, así como la compresibilidad adiabática. Específicamente, tanto DOPC y DMPC están en la fase de LD (por encima de su T_m , Tabla 1 a continuación) al (24°C, así como a 37°C. Sin embargo, la Tabla 2 demuestra que la capacidad de lubricación de los liposomas de DMPC es sustancialmente superior a la de DOPC. Sin estar limitado por la teoría, se cree que la diferencia de comportamiento entre DMPC y DOPC reside en el hecho de que en condiciones fisiológicas, es decir a una temperatura de entre 36°C y 43°C DMPC, es sólo ligeramente por encima de la T_m . Por otra parte, la temperatura en articulaciones sinoviales de la mano pueden ser tan bajas como $\sim 28^\circ\text{C}$. En tales condiciones DMPC también está ligeramente por encima de la T_m . Además, DMPC es el PC con las cadenas de acilo más cortas capaces de formar liposomas estables, componiendo así la bicapa mecánicamente "suave" de todas las demás bicapas de PC de un solo componente ejemplificado aquí⁴⁴.

- La capacidad de lubricación de MLV compuesta de mezcla DM-PC/DPPC (0,6:1,0 mol/mol) que tiene buenas propiedades de miscibilidad casi ideales, y una temperatura de transición de fase SO-a-LD combinada de $\sim 34^\circ\text{C}$. El DMPC/DPPC-MLV mostró una eficacia alta de lubricantes a 37°C (coeficientes de fricción estática y

dinámica de 0,017 y 0,0083, respectivamente), pero no a 24°C (0,042 y 0,021, respectivamente), en comparación con DPPC-MLV solo (T_m de 41,4°C), que eran inferiores a 37°C (0,029 y 0,022, para los coeficientes de fricción dinámicos y estáticos, respectivamente);

- La "debilidad" y nivel de hidratación de DMPC-MLV y el impacto de cambios en estas características en lubricación de cartílago. La primera modificación en introducción que incluye formulación de ~33 mol% de colesterol en membranas de liposomas. Como se muestra más adelante, esto dio lugar a una transición física de la fase de LD a la fase líquido-ordenada (LO)³⁴. Tal cambio se sabe que "seca" el lípido bicapa⁵⁶, y también se refleja en una reducción en la compresibilidad adiabática y por lo tanto en debilidad bicapa. Por lo tanto, el lubricante de cartílago con DMPC/colesterol-MLV fue sustancialmente inferior a la lubricación del cartílago con DMPC-MLV (**Tabla 2** o **Fig. 1**). En otra modificación 5% en moles del lipopolímero mPEG-DSPE en la bicapa lipídica de DMPC-MLV se introdujo. Los restos de PEG, que se extienden desde 4 hasta 10 nm de la superficie del liposoma (dependiendo del estado de la cadena de polímero, siendo ya sea en una configuración hongo o un cepillo³⁹), y son de flexibilidad alta e hidratación alta (de 3 a 4 moléculas de agua por grupo de óxido de etileno)⁴⁵. Sin embargo, la adición de mPEG-DSPE con los liposomas de DMPC no mejoró lubricación (**Fig. 1**), que parecía contradecir la función de la hidratación en la lubricación. Esto puede explicarse por el hecho de que el resto de Al-PEG aunque altamente polar es no iónico y por lo tanto su hidratación difiere de la de la hidratación del grupo de cabeza iónico PC⁴⁵. Hay que señalar, que estos restos de PEG injertados pueden todavía ser beneficiosos en vivo, ya que pueden proteger a los liposomas de la interacción con macromoléculas de fluido intersticial³⁴, de manera similar al comportamiento protector de cartílago de HA²²;

- Los coeficientes de fricción obtenidos por los diferentes medios de comunicación (salina, ISF, y HB de baja fuerza iónica) demostraron que HB fue superior a la de solución salina y de ISF (**Tabla 2** y **Fig. 1**). Además, la concentración total de PL de especímenes de cartílago lubricados con HB fue casi el doble que la de cartílago lubricado con ISF y sustancialmente mayor que la del cartílago lubricado con solución salina (**Fig. 2**). Lo que sugiere que la HB puede mejor retener SAPLs de cartílago de origen natural, y mejorar con ello la lubricación. La superioridad de HB sobre la solución salina (**Fig. 1**) también se puede explicar por su fuerza iónica más baja, lo que induce un embalaje PL menos compacto en la bicapa lipídica, lo que permite una rápida recuperación de bicapa después de eventos de fricción^{34, 57}. Esto apoya la importancia de la debilidad de bicapa como un importante contribuyente a la lubricación eficaz. De lo anterior, se hizo evidente que HB es un medio eficaz y propicio para los liposomas como lubricantes;

- Multilamelares largos DMPC-MLV se encontraron para ser superior a los pequeños liposomas unilamelares (<100 nm). Sin estar limitados por la teoría, ya que no se requiere para el establecimiento de la invención, se cree que esta superioridad se deriva de la forma en que aquéllos se retienen cerca de la superficie del cartílago, como lo demuestra por la distribución PC a lo largo de la profundidad del cartílago (**Fig. 3**), debido al gran tamaño de MLV (0,8-3,5 µm de diámetro). Maroudas et al. informaron de la presencia de lagunas de 100 Nm entre las fibras de colágeno en el cartílago⁵⁰. Stockwell y Barnett⁵¹ y Barnett y Palfrey⁵² afirmaron que estas fibras actúan como barreras contra la penetración de partículas grandes en el cartílago, informando de que las partículas pequeñas de plata proteinada penetraron más profundamente que las partículas grandes en el cartílago. Los resultados presentados en este documento muestran que la DMPC-SUV más pequeña penetró profundamente en el cartílago, mientras que DMPC-MLV se mantuvo cerca de la superficie (**Fig. 3**). Esto está de acuerdo de la similitud de los niveles de fricción obtenidos a partir de cartílago lubricado con DMPC-SUV en HB y de cartílago lubricado con HB sola (**Fig. 1**), al penetrar la DM-PC-SUV profundamente en el cartílago el efecto de lubricación es sobre todo de los medios de comunicación (es decir, HB).

- Estudios morfológicos SEM, en los que estructuras globulares que ocurren naturalmente, en el rango de tamaño de DM-PC-MLV, parecían estar presentes en la superficie del cartílago no lubricado saludable antes de realizar los ensayos de fricción (**Fig. 4A**), y ausentes después de las pruebas de fricción de cartílago sano lubricado con solución salina o ISF (**Figs. 4C** y **4D**, respectivamente). Espécimen de cartílago lubricados con DMPC-MLV parecían tener estructuras lipídicas globulares en su superficie, después de llevarse a cabo pruebas de fricción (**Fig. 4F**).

[0032] A la luz de estos resultados, se ha previsto que los fosfolípidos (PL) seleccionados de glicerofosfolípidos (GPL) y esfingolípidos (SPL), son posibles sustituyentes para estructuras globulares lipídicas de origen natural, siendo capaz de reducción de la fricción y protección contra el desgaste del cartílago.

[0033] Además, se ha previsto que cuando está presente cerca de la superficie del cartílago que comprende liposomas GPL, SPL o su combinación a media que los fosfolípidos de formación de liposoma actúan como un depósito para la reposición de una bicapa lipídica protectora recubriendo la superficie del cartílago, por lo tanto consistente en la preservación de PL de origen natural, tal como se indica por el nivel PL total más alto en el cartílago lubricado con DMPC-MLV en comparación con el cartílago lubricado con otros lubricantes y medios de comunicación (**Fig. 2**).

[0034] De acuerdo con algunas realizaciones de la invención, el GPL está llevando un grupo de cabeza de fosfocolina (fosfatidilcolina, lípido a base de PC) o un grupo de cabeza de fosfoglicerol (fosfatidilglicerol, lípido a base

de PG), y el SPL es una ceramida (N-acilo sfingosina que lleva un grupo de cabeza de fosfocolina, también conocido como N-acilo sfingosilo-fsfocolina (lípidos a base de SM).

[0035] Como se apreciará por los expertos en técnicas basadas en lípidos, PCs y SMS son fosfolípidos zwitteriónicos con la colina catiónica y restos de fosfato de diéster aniónico (que constituyen el grupo de cabeza de fopshocolina) permanecen totalmente ionizado sobre un amplio rango de pH sin carga neta (potencial zeta = 0 mV)³⁴. el PG está cargada negativamente en el más amplio rango de pH como es evidente del potencial zeta negativo. la parte hidrófoba de la PC y PG incluye 2 de hidrocarburos (por ejemplo, cadenas de acilos y alquilos). La SM también tiene dos cadenas de hidrocarburo de hidrofóbico de las cuales una es la cadena de la propia base esfingoide y el otro es la cadena de N-acilo. PC, SM y PG en el que las cadenas de hidrocarburo están por encima de 12 átomos de carbono son todas en forma similar a cilindro, ya que su parámetro de embalaje está en el intervalo de 0,74 a 1,0. Forman bicapas de lípidos, las cuales, por encima de la transición de fase LD, pasan a ser altamente hidratadas y vesiculares para formar vesículas lipídicas (liposomas)^{34, 35}. Las bicapas de liposomas PC y PG pueden ser o bien una fase sólida ordenada (SO) (denominada anteriormente como gel o en fase sólida), o bien en una fase desordenada líquida (LD) (previamente se refiere a cristalino como líquido o fase de fluido)³⁴. La transformación entre el pliegue de fases LD implica una primera transición de fase endotérmica de primer orden denominada como transición de fase principal. T_m es la temperatura en la que se produce el cambio máximo en el cambio de capacidad de calor durante el SO de transición de fase LD. T_m y el rango de temperatura de la SO hasta la transición de fase LD de PC depende, entre otras cosas, de la composición de la cadena de hidrocarburos PC. En la fase de LD (pero no en la fase de SO), el grupo de cabeza de fopshocolina y fosfoglicerol cargado es altamente hidratado.

[0036] Se observa, además, que las PGs y SM tienen T_m que son similares a la de la PC correspondiente (la misma longitud de la sustitución de la cadena de hidrocarburos). Por ejemplo, la T_m de DMPG es idéntica a la de DMPC, a saber, 23°C, y la de DPPG o N-palmitoil SM es idéntica a la de DPPC, a saber, 41°C.

[0037] Una mezcla de dos o más PLs (por ejemplo, dos PC diferentes, un PC con PG, dos PGs diferentes, dos de SM, un PC o PG con SM, etc.) pueden ser utilizados, siempre que la mezcla formada se encuentra en un estado LD y los grupos de cabeza de lípidos son altamente hidratados, cuando *in situ* (ya sea en la región articular de una articulación sana o en estado de mal funcionamiento).

[0038] Después de considerar lo anterior, los inventores han desarrollado sistemas de liposomas para la lubricación de las articulaciones, que son químicamente estables, resistentes a los daños de oxidación y libres de HA.

[0039] Los liposomas se caracterizan porque comprenden una o más membranas con al menos un fosfolípido (PL) del grupo que consiste en un fosfolípido (GPL) que tiene dos, teniendo cadenas de hidrocarburo iguales o diferentes C₁₂-C₁₆ y una esfingomielina (SM) que tiene una cadena de hidrocarburo C₁₂-C₁₈. La fase de temperatura de transición en la que fase de transición de sólido ordenado (SO) líquido desordenado (LD) ocurre, está dentro de un rango de temperatura de aproximadamente 20°C a aproximadamente 39°C. Los liposomas se utilizan para lubricar las articulaciones que tienen una temperatura conjunta que es algo mayor que la temperatura de transición de fase. De acuerdo con ello, los liposomas son en una fase LD dentro de la articulación. El hecho de que la temperatura de unión es típicamente sólo ligeramente (por ejemplo, dentro del intervalo de aproximadamente 1°C a aproximadamente 15°C, como se detalla más arriba) por encima de la temperatura de transición de fase parece ser de importancia para la lubricación eficiente.

[0040] En una realización, dichas cadenas hidrófobas C₁₂-C₁₆ o C₁₂-C₁₈ están saturadas.

[0041] Hay que señalar que las anteriores condiciones son acumulativas, es decir, la selección de PL (ya sea una sola PL o una combinación de PL con PL adicionales) que figuran en el liposoma es para que el liposoma tenga temperatura de transición de fase SO-LD entre alrededor de 20°C a aproximadamente 39°C.

[0042] El GPL, así como el SM son altamente hidratados, es decir, el número de moléculas de agua por grupo de cabeza de lípidos es al menos aproximadamente 6; 7 o, a veces, al menos, 8 moléculas de agua que forman complejos con el grupo de cabeza ionizado de la GPL o SPL.

[0043] El GPL o SM son capaces de formar MLV (así como el otro tipo de liposomas mencionados anteriormente), preferiblemente MLV tiene un diámetro medio por encima de 0,3 µm. De acuerdo con una realización, el MLV se define por un diámetro medio en el intervalo de entre 0,3 µm y 5 µm.

[0044] Al demostrarse que el colesterol reduce las propiedades de lubricación del MLV que se forma a partir de GPL, SM o sus combinaciones, como se define en el presente documento, el MLV o los otros tipos de liposomas que se pueden utilizar de acuerdo con la invención, no deben incluir en sus bicapas un esteroide activo de membrana, tales como colesterol. Un esteroide de membrana activa se define por afectar el orden de lípidos de rango de corto y largo plazo de las membranas, lo que minimiza el volumen y la disminución de la permeabilidad de la membrana. Específicamente, el esteroide debe poseer 1), un sistema de anillo plano fundido, 2), un grupo hidroxilo u otro grupo polar pequeño en la posición 3, 3), una cola "de tipo colesterol", y 4), una pequeña área por molécula (<40 Å² cuando se ensamblan en la interfase aire/agua a una presión superficial de 12 mN/m).

[0045] Es de notar que las composiciones de la invención preferiblemente no contienen propilenglicol.

[0046] Además, debe observarse que las composiciones de la invención preferiblemente no contienen dextrano.

5 [0047] Un grupo particular de GPLs abarcado por una o más de las realizaciones anteriores comprenden un grupo de cabeza de fosfocolina que lleva un GPL (lípidos basados en PC o SM). Una PC preferida de acuerdo con la invención es dimiristoilfosfatidilcolina (DMPC).

10 [0048] Ejemplos no limitantes de lípidos basados en PC que se pueden usar en de acuerdo con la invención comprenden 1,2-dipalmitoil-*sn*-glicero-3-fosfocolina (DPPC, T_m 41,4°C); 1,2-dipentadecanoil-*sn*-glicero-3-fosfocolina (C15, T_m 33,0°C). SPL que puede ser de acuerdo con la invención comprende una esfingomielina (SM) llevando un grupo de fosfocolina, y no limitativo, ejemplos incluyen N-palmitoil SM T_m 41,0°C y 1, 2-dimiristoil-*sn*-glicero-3-PC. Valores de T_m de varios lípidos basados en PC se pueden encontrar en "Thermotropic Phase Transitions of Pure Lipids in Model Membranes and Their Modifications by Membrane Proteins", John R. Silvius, Lipid-Protein Interactions, John Wiley & Sons, Inc., Nueva York, 1982, y también en la Lipid Thermotropic Phase Transition Data Base - LIPIDAT, y en Marsh (1990)³⁶.

20 [0049] Se hace notar que de acuerdo con la invención, los liposomas MLV (o los otros liposomas útiles de acuerdo con la invención) tienen un offset de temperatura (límite superior) de la transición de fase SO a LD que no es mayor que 15°C de la temperatura *in situ*, es decir, en la unión, dentro del intervalo de aproximadamente 20°C a aproximadamente 39°C. De acuerdo con la invención, los liposomas MLV se forman a partir de GPL, SPL o su combinación, y el SO a la temperatura de transición de fase LD se ha descrito anteriormente por lo tanto se refiere a liposomas MLV que se forman a partir de GPL, SPL y combinaciones de los mismos, proporcionando de este modo un liposoma en el que PLs o su mezcla están en fase de LD.

25 [0050] También se describe el uso de DMPC-MLV o DM-PC/DPPC-MLV para la preparación de un reemplazo de cartílago PL de origen natural, es decir, como un lubricante y el desgaste del cartílago reductor. Estos MLV tienen importantes ventajas prácticas también. Se pueden preparar de forma sencilla y a bajo costo. Tanto DMPC como DPPC son resistentes al daño oxidativo y estable durante largos períodos de tiempo. Por otra parte, estos equipos ya están aprobados para uso humano. Cuando se utiliza una mezcla de DMPC y DPPC, la relación molar entre DMPC y DPPC depende de la temperatura de la articulación a tratar y está diseñada de tal manera que T_m de la combinación proporciona MLV en fase LD. Un ejemplo de una proporción adecuada es de aproximadamente 0,6/1,0 que proporciona MLV en fase de LD a una temperatura conjunta de entre 35°C a 39°C.

35 [0051] También se describe un método para lubricar una articulación de un mamífero, el método comprende la administración en una cavidad de dicha junta que contiene una cantidad de fluido sinovial de liposomas efectivas para producir un efecto lubricante.

40 [0052] Hay que señalar que la temperatura de las articulaciones en los pacientes que sufren de lubricación de articulaciones reducidas con el desgaste en las articulaciones, como la artrosis varía a medida que la enfermedad procede [Hollander, J. L.; Moore, R., Studies in osteoarthritis using Intra-Articular Temperature Response to Injection of Hydrocortisone. Ann. Rheum. Dis. 1956, 15, (4), 320-326]. De hecho, este cambio de temperatura se utiliza como una herramienta clínica para evaluar la inflamación de osteoartritis [Thomas, D.; Ansell, B. M.; Smith, D. S.; Isaacs, R. J., Knee Joint Temperature Measurement using a Differential Thermistor Thermometer. Rheumatology 1980, 19, (1), 8-13]. En articulaciones de mano de pacientes de osteoartritis, se demostró que la temperatura varía desde ~28 a ~33°C [Varju, G.; Pieper, C. F.; Renner, J. B.; Kraus, V. B., Assessment of hand osteoarthritis: correlation between thermographic and radiographic methods. Rheumatology 2004, 43, 915-919], mientras que la temperatura de la articulación temporo-mandibular sana (ATM) varía de ~35 a 37°C [Akerman, S.; Kopp, S., Intra-articular and skin surface temperature of human temporomandibular joint. Scand. J. Dent. Res. 1987, 95, (6), 493-498].

[0053] Por lo tanto, es esencial y, de hecho, un requisito previo que la GPL o la mezcla de la misma con PL adicionales, esté en una fase de LD, *in situ*, en la región de la unión a lubricarse.

55 [0054] El método puede usarse para tratar, aliviar, retrasar, prevenir, controlar o curar cualquier enfermedad o los síntomas que surgen que se asocian con disfunción articular. Para los fines de esta descripción el término "**trastorno articular**" se emplea para referirse a cualquier disfunción (congénita, autoinmune o de otro tipo), lesión o enfermedad de la región articular que provoca la degeneración, dolor, disminución de la movilidad, inflamación o interrupción fisiológica y disfunción de las articulaciones. El trastorno puede estar asociado con una reducción de la secreción de las articulaciones y lubricación, así como de las complicaciones de la rodilla y prótesis de cadera.

[0055] La articulación puede ser cualquiera de la de la rodilla, cadera, tobillo, hombro, codo, tarso, carpo, interfalángica e intervertebral.

65 [0056] Trastornos articulares específicos incluyen, pero no se limitan a, las deficiencias de la secreción y/o lubricación de las articulaciones que surge de la artritis, incluidas las condiciones de la erosión articular en la artritis

reumatoide, la osteoartritis, la osteoartritis en pacientes con artritis reumatoide, lesión articular traumática (incluyendo lesiones deportivas), articulación bloqueada (como en las articulaciones temporo-mandibulares (ATM)), el estado de post artrocentesis, la cirugía artroscópica, cirugía de la articulación abierta, las articulaciones (por ejemplo, reemplazo de rodilla o cadera) en mamíferos, preferiblemente seres humanos. Un trastorno preferido que va a tratarse o prevenirse por el método de la invención es la osteoartritis.

[0057] El método se podría utilizar como medida profiláctica para prevenir el daño futuro o degeneración. Por ejemplo, los liposomas MLV a base de PL podrían ser administrados por vía intra-articular a los atletas intermitentemente a lo largo de su carrera para reducir al mínimo el riesgo de lesiones relacionadas con el estrés o la degeneración del cartílago.

[0058] El método puede ser utilizado con independencia de, o como un adjunto a, agentes antiinflamatorios, agentes analgésicos, relajantes musculares, antidepresivos, o agentes que promueven lubricación de las articulaciones comúnmente utilizadas para tratar trastornos asociados con la rigidez de las articulaciones, tales como la artritis. Un enfoque terapéutico combinado es beneficioso en la reducción de los efectos secundarios asociados con los agentes, como no esteroideos, fármacos antiinflamatorios no esteroideos (AINE), utilizado comúnmente para prevenir, gestionar o tratar trastornos como la artrosis asociada con una menor lubricación de las articulaciones. Además de mejorar la seguridad, un enfoque terapéutico combinado también puede ser ventajoso en el aumento de la eficacia del tratamiento.

[0059] La administración de los liposomas en una cavidad articular de un paciente puede ser por un método seleccionado del grupo que consiste en la inyección intra-articular, administración artroscópica o administración quirúrgica.

[0060] También se describe una composición farmacéutica para lubricación de las articulaciones que comprende un vehículo fisiológicamente aceptable y los liposomas que comprende al menos una PL seleccionada de GPL o SPL como se define aquí.

[0061] El vehículo fisiológicamente aceptable puede ser ácido hialurónico (HA) o tampón de histidina (HB). La composición también puede incluir polímeros tales como los descritos por Klein, 2006³¹.

[0062] La composición puede estar en una forma adecuada para la administración por una ruta seleccionada de inyección intra-articular, la administración artroscópica o administración quirúrgica.

[0063] La cantidad de liposomas en la composición variará dependiendo de la composición del liposoma PL, la enfermedad, su gravedad y régimen de tratamiento, así como una de la edad, peso, etc., del mamífero a tratar. La cantidad para los propósitos en la presente memoria se determina por tales consideraciones como puede conocerse en la técnica. La cantidad debe ser eficaz para lograr una mejora en la lubricación de la articulación tratada, es decir, para reducir la fricción entre los cartílagos que forman la articulación, la mejora puede ser exhibida por pruebas clínicas, así como por una mejora en el bienestar del sujeto sometido a dicho tratamiento (por ejemplo, reducción del dolor en la articulación afectada, la mejora de la movilidad). La cantidad efectiva se determina normalmente en ensayos clínicos adecuadamente diseñados (estudios de rango de dosis) y expertos en la técnica sabrán cómo realizar correctamente este tipo de ensayos con el fin de determinar la cantidad efectiva.

[0064] A lo largo de la descripción y reivindicaciones de esta memoria, las formas singulares "*un*", "*una*" y "*el*" incluyen referencias plurales a menos que el contexto indique claramente lo contrario. Así, por ejemplo, una referencia a "un PL" es una referencia a uno o más PLs y "un liposoma" se refiere a uno o más liposomas. A lo largo de la descripción y reivindicaciones de esta memoria, las formas plurales de palabras incluyen referencias singulares también, a menos que el contexto indique claramente lo contrario.

[0065] Sin embargo, a lo largo de la descripción y reivindicaciones de esta memoria, los términos "*comprende*" y "*contienen*" y variaciones de las palabras, por ejemplo "*que comprende*" y "*comprende*", significan "*incluyendo, pero no limitado a*", y no se destinan a y no excluyen otros restos, aditivos, componentes, números enteros o etapas.

[0066] La invención se describirá ahora a modo de ejemplos no limitativos.

DESCRIPCIÓN DE EJEMPLOS NO LIMITANTES

Materiales y métodos

[0067] **Lípidos:** Los lípidos utilizados en este estudio y sus fuentes se describen en la Tabla 1; todos son de pureza >98%. La Tabla 1 también presenta el sólido ordenado (SO) a temperaturas de transición de fase líquido-desordenadas (LD), T_m , de bicapas de fosfolípidos,³⁴⁻³⁶ así como el estado de bicapa a 37°C.

[0068] **Agua:** El agua se purificó usando un sistema híbrido WaterPro PS HPLC/Ultrafiltro (Labconco, Kansas City,

MO), proporcionando el suministro de agua libre de pirógenos con bajos niveles de carbonos totales e iones inorgánicos (18,2MΩ).

[0069] Reactivos: Todos los demás reactivos utilizados son de calidad analítica o mejor.

[0070] Liposomas: Los liposomas multilamelares (MLV) se prepararon disolviendo los lípidos deseados en terc-butanol, seguido de liofilización para formar una "torta" seca. Esto se hidrató en fuerza iónica baja (5 mM) tampón de histidina (HB) pH 6,7, a una temperatura de al menos 5°C por encima de la T_m^{34} . Cuando se desee, MLV se redujo para formar pequeñas vesículas unilaminares (<100 nm, SUV) por extrusión por pasos a través de membranas de policarbonato (GE-Osmonics, Minnetonka, MN), a partir de un 400-nm y terminando con una membrana de tamaño de poro de 50-NM, utilizando un sistema de extrusión de 10-mL (Northern Lipids, Vancouver, Canadá) se calienta al menos 5°C por encima de la T_m^{37} .

[0071] La selección inicial de los lubricantes de cartílago se llevó a cabo con MLV de diferentes composiciones de PC - DMPC, DPPC, HSPC, DBPC, DOPC y POPC (para abreviaturas, véase la **Tabla 1**). En esta prueba de detección se encontró que los liposomas de DMPC actuaron como los mejores reductores de fricción (**Tabla 2**). Por lo tanto, los liposomas basados en DMPC se investigaron más liposomas que comparan compuestos de cualquiera de la DMPC sola, de diferentes tamaños y laminaridades, o de una mezcla de DMPC/DPPC (0,6:1,0 relación molar), o de DMPC en combinación con colesterol (2:1 relación molar), o de DMPC combinada con el lipopolímero mPEG-DSPE (95:5 relación molar). El mPEG-DSPE utilizado consiste en un polietilenglicol 2.000 Dalton unido al grupo amino primario de diestearoil fosfatidiletanolamina.

[0072] Caracterización de liposomas: Los liposomas se caracterizan por:

(i) *fosfolípidos (PL) concentración*, usando el ensayo Bartlett modificado ^{37, 38},

(ii) *distribución de tamaño*, para los liposomas de menos de 1 µm por dispersión de luz dinámica utilizando un rendimiento ALV-NIBS Medidor de partículas de rendimiento alto (Langen, Alemania) a un ángulo de dispersión de 173°; y para los liposomas anteriores 400 nm mediante difracción de la luz usando un Analizador de tamaño de partículas LS Beckman Coulter de 13 a 320 (Fullerton, CA), equipado con una dispersión de intensidad de polarización diferencial (PIDS) para proporcionar un rango de detección dinámica de 40 nm a 2000 µm;

(iii) *compresibilidad adiabática específica parcial*, por cálculo de la densidad de la dispersión de liposomas (utilizando un medidor de densidad DMA 5000, Anton Paar, Graz, Austria) y la velocidad de una onda ultrasónica 5 MHz que viaja a través de él (usando un velocímetro ultrasónico UCC-12, NDT Instruments, Jerusalén, Israel), según lo descrito por Garbuzenko et al. ³⁹; y

(iv) *estructura*, usando microscopía electrónica de escaneo

[0073] Cartílago: El cartílago articular de los seres humanos sanos o OA (de 65 años a 86 años) se obtuvo de operaciones de fractura de cabeza femorales o los reemplazos totales de cadera. Tapones completos de cartílago (4 y 8 mm de diámetro, -1.5 cm de espesor) se retiraron de la zona de soporte de carga de la cabeza femoral y, posteriormente recortado, en el lado del hueso, utilizando un microtomo de congelación 1320 Leica, resultando en discos de cartílago planos, 2 mm de espesor, que se llevó a cabo a -20°C.

[0074] Fricción y pruebas de desgaste: Los liposomas que cubre una amplia gama de tamaños y de concentraciones, dispersados en HB, fueron seleccionados como lubricantes potenciales para reducir la fricción y el desgaste entre dos discos de cartílago humano a 24°C y 37°C. Mediciones de fricción se realizaron con una configuración de cartílago en cartílago (Merkher, Y.; Sivan, S.; Etsion, I.; Maroudas, A.; Halperin, G.; Yosef, A., una prueba de fricción de junta humana racional que usa una disposición cartílago-en-cartílago humano. Tribol. Lett. 2006, 22, 29-36), utilizando dos discos de cartílago inmersos en una dispersión de liposoma en HB, o como controles, en HB sola, o en solución salina fisiológica (0,9% w/v; pH 5,0; Teva Medical, Israel), o en el líquido sinovial inflamado (ISF) obtenido a partir de pacientes con OA. Estos discos se sometieron a deslizante relativo sobre una amplia gama de cargas (1-30 N), lo que equivale a las presiones fisiológicas en las articulaciones (0,08 a 2,4 MPa). Varias velocidades deslizantes (de 0,5 a 2 mm/s) y tiempos de permanencia (de 5 a 300 s) se utilizan para simular, junto con diversas cargas, una gama de movimientos fisiológicos.

[0075] Para la evaluación de desgaste, se determinó el efecto de ensayos de fricción de la concentración del total de PL en el cartílago, y en la estructura de la superficie del cartílago.

[0076] Extracción y cuantificación PL: Total PL se extrajeron a partir de muestras de cartílago antes y después de las pruebas de lubricación, utilizando el procedimiento de extracción de Bligh y Dyer ^{41, 42}. Para esto, las muestras de cartílago se incubaron en una solución de cloroformo-metanol (1:1 v/v) durante 1 hora a 37°C. Se añadió agua a una relación de metanol cloroformo-agua final de 1: 1: 1, la solución se agitó en vórtice durante 1 min y después se centrifugó, utilizando una centrífuga de mesa de trabajo, para formar dos fases. La fase inferior de cloroformo-rico, que contiene PL, se recogió, se secó bajo vacío (concentrador 5301, Eppendorf), y el residuo (que contiene lípidos)

se volvió a disolver en un pequeño volumen de solución cloroformo-metanol (2:1 v/v) y después se cargó en placas de vidrio recubiertas con gel de sílice phorus de bajo fosfato (Uniplate - Silica Gel G, Analtech, Newark, DE). Un sistema de disolvente cloroformo-metanol-agua (65:25:4 v/v/v) se utilizó para TLC⁴¹. Marcadores comerciales de esfingomielina, PC y PE también se cargaron en las placas de identificación in situ. Se detectaron manchas de lípidos después de la pulverización de las placas de TLC secas con una solución primulina UV-detectable (Sigma) (1 ml de 0,1% w/v primulina en agua, añadido a 100 ml de acetona-agua, 4:1 v/v). Cada punto de PL se raspó de la placa de TLC, y su contenido de PL se cuantificó mediante el procedimiento de Bartlett modificado.^{37, 38}

[0077] Una concentración PL también se cuantificó como una función (SEM) de profundidad de cartílago. Para esto, las muestras de cartílago se seccionaron por microtomo en rodajas 20 o 50 µm de espesor, a partir de la superficie del cartílago hacia el interior, paralela a la cara del cartílago. Concentración PL de cada parte fue cuantificada, después de que la PL se extrajo como se ha mencionado anteriormente, por el procedimiento modificado Bartlett^{37,38}.

[0078] Estructura del cartílago: la estructura del cartílago se examinó por SEM. Las muestras se conservaron por enfriamiento rápido en nitrógeno líquido y se mantienen bajo vacío (~ 15 mbar) durante 48 h para eliminar el exceso de agua. A continuación, las muestras fueron montadas en trozos y revestidas por bombardeo iónico con oro en una Polaron E5100 Sputter Coater (Watford, Inglaterra). Las muestras se examinaron utilizando un sistema de microscopía electrónica de escaneo FEI Quanta 200 (Polaron) usando un voltaje de aceleración de 30 kV.

Resultados

[0079] Los fosfolípidos tensioactivos (SAPL) probados eran fosfatidilcolinas (PC), que también están naturalmente presentes en el cartílago y el líquido sinovial.

[0080] Liposomas de escaneo para la lubricación de cartílago y el desgaste del cartílago de reducción, la comparación implicada de los coeficientes de fricción estática y dinámica obtenidos con MLV compuestas por varios ordenadores de un solo componente (tal como se describe en *Materiales y Métodos* y en la **Tabla 1**). Las PCs ejemplificadas difieren en sus cadenas de acilo, que determinan las características básicas de los liposomas, especialmente la T_m y el estado físico.

[0081] Revisión de liposomas de composiciones diferentes de PC: Revisión de MLV (0,8 a 3,5 µm de diámetro) se compone de diferentes PCs (DMPC, DPPC, HSPC, DB-PC, DOPC y POPC) reveló que tanto a 24°C como a 37°C, DMPC era el lubricante cartílago con mejores resultados (**Tabla 2**). En cuanto a los medios de dispersión de liposomas, se encontró que la eficacia de la lubricación de HB es mejor que la de solución salina o de ISF (Tabla 2 y Fig. 1). Además, los liposomas dispersados en HB eran mejores lubricantes que los liposomas dispersados en solución salina (datos no mostrados).

[0082] Fricción y desgaste en el cartílago lubricado con varios liposomas basados en DMPC: Investigando el efecto de tamaño de los liposomas y lamellaridad, la eficacia lubricante de los liposomas de DMPC multilamelares (DMPC-MLV) se comparó con la de <100 nm liposomas unilamelares DMPC (DMPC-SUV). Además, la eficacia como lubricantes de cartílago de DMPC-MLV enriquecidos con lípidos que no son formadores de liposomas, aunque son componentes comunes de liposoma, tales como colesterol o mPEG-DSPE, se estudió. El colesterol, que tiene un parámetro de embalaje de ~1,2³⁹, se añadió a ~33% en moles para formar DMPC/colesterol-MLV, lo que provoca la transformación de la bicapa lipídica de sólido ordenado (SO, si PL están por debajo de la T_m) o fase líquido-desordenada (LD, si PL están por encima de T_m) para una nueva fase física denominada líquido-ordenado (LO)^{43, 44}. De esta manera, fue posible comparar el efecto de liposomas en las tres fases de dos capas diferentes LD, SO y LO en lubricación. Otro componente añadido a DMPC-MLV era el lipopolímero mPEG-DSPE, que tiene un parámetro relativamente bajo de embalaje de ~0,5³⁹, que introduce una barrera estérica altamente hidratada extendida que rodea la liposoma^{39, 45}. mPEG-DSPE se añadió a 5 % en moles para formar DMPC/mPEG-DSPE-MLV.

[0083] Los coeficientes de fricción estática y dinámica de DMPC-MLV en MP (0.020 y 0.011, respectivamente) fueron inferiores a los obtenidos con DMPC/colesterol-MLV en HB (0,040 y 0,036, respectivamente) o DMPC/mPEG DSPE-MLV en HB (0,022 y 0,023, respectivamente), como se muestra en la **Fig. 1**, y eran similares a los coeficientes de baja fricción que existen en articulaciones⁴⁶ sinoviales saludables. Más aún, los coeficientes de fricción estática y dinámica de cartílago lubricado con DMPC-MLV fueron inferiores a los del cartílago lubricado con DMPC-SUV (0,045 y 0,036, respectivamente), que fueron sólo ligeramente inferiores a los de HB sola (0,053 y 0,037, respectivamente), **Fig. 1**.

[0084] La evaluación estadística, mediante la prueba t de Student, indica la superioridad de DMPC-MLV sobre las otras formulaciones de liposoma ensayadas en este ensayo y los medios de comunicación ($p < 0,008$).

[0085] Compresibilidad de la bicapa lipídica: La compresibilidad adiabática parcial específica, K, es una medida tanto de la fase física de la bicapa lipídica (SO, LD o LO) y de su estado de hidratación, que se postula en este documento para tener una importante contribución a la eficacia de los liposomas como reductores de fricción y desgaste⁴⁵. Valores de K para DMPC, DPPC y fosfatidilcolina hidrogenada de soja (HSPC) determinada a 37°C

fueron $50,7$, $31,2$ y $33,3 \times 10^{-6}$ mL/(g-atm), respectivamente. Un perfil similar, con valores algo más bajos de K , $46,4$, $28,0$ y $30,3 \times 10^{-6}$ mL/(g-atm), se encontró a 24°C para DMPC, DPPC y HSPC respectivamente. Estos valores de K reflejan las temperaturas de transición más altas de fase, T_m , de DPPC y HSPC ($41,4^{\circ}\text{C}$, $52,5^{\circ}\text{C}$) que la de DMPC ($23,2^{\circ}\text{C}$). En liposomas DM-PC /colesterol (2:1 relación molar) K se reduce a $42,2$ y $45,5 \times 10^{-6}$ mL/(g-atm) a 24°C y 37°C , respectivamente. La introducción de 5% en moles de mPEG-DSPE en liposomas HSPC (T_m 53°C)⁴⁹ eleva la compresibilidad a $32,8$ y $35,5 \times 10^{-6}$ mL/(g-atm) a 24°C y 37°C , respectivamente. Mientras que en liposomas HSPC/colesterol (2:1 relación molar) K se reduce a $30,0$ y $33,6 \times 10^{-6}$ mL/(atm g-) a 24°C y 37°C .

[0086] Sin limitarse por la teoría, los resultados anteriores sugieren que la fase física de las bicapas de MLV son importantes para biolubricación de cartílago, y que las condiciones óptimas para la lubricación están en la fase de LD, no muy por encima de la temperatura de transición de fase SO-a-LD (T_m). A fin de poner a prueba esta hipótesis, los inventores probaron MLV compuesto de 0,6/1,0 (mol/mol) DMPC/DP-PC. Esta composición se selecciona de modo que permita la formación de un liposoma que tiene una T_m de $\sim 34^{\circ}\text{C}$ ⁴⁷ (siendo posible debido a la mezcla casi ideal de estos dos PCs). Estos MLV se estudiaron a 24°C y 37°C . Los resultados apoyan claramente la hipótesis anterior, ya que muestran (**Fig. 1**) que DMPC/DPPC-MLV son los lubricantes más eficaces a 37°C (coeficiente de fricción estática y dinámica de 0,017 y 0,0083, respectivamente), pero no a los 24°C (coeficiente de fricción estática y dinámica de 0,042 y 0,021, respectivamente). Además, DMPC/DPPC-MLV fueron superiores a DPPC-MLV ($T_m = 41,3$) por sí sola, que son inferiores a 37°C (coeficiente de fricción estática y dinámica de 0,029 y 0,022, respectivamente).

[0087] Niveles de PL en muestras de cartílago lubricadas: Los niveles de PL general (que incluye de SAPLs y PLS de origen natural de liposomas) de especímenes de cartílago sano (espesor $\sim 1200 \mu\text{m}$), antes y después de ser sometidos a ensayos de fricción, en presencia de diferentes lubricantes y medios, se midió. Se puede observar (**Fig. 2**) que la concentración total de PL en el cartílago lubricado con DMPC-MLV es el más alto entre todas las muestras ensayadas. La concentración de PL de cartílago obtenido a partir de sujetos sanos y lubricados con HB es más alta que la de cartílago similar lubricado con solución salina o ISF, este último (ISF), tiene niveles similares de PL a los de cartílago obtenido a partir de pacientes con OA.

[0088] Efecto de tamaño de los liposomas y lamellaridad en su penetración en Cartílago: Concentración de PC, como una función de profundidad de cartílago (0 a $800 \mu\text{m}$, en incrementos 20 a $50 \mu\text{m}$), se midió después de las pruebas de fricción para los especímenes lubricados con DMPC-MLV y DMPC-SUV, tanto dispersos en HB, como para especímenes lubricados con HB sola (control). Entre estas muestras, el cartílago lubricado con DMPC-MLV tenía la mayor concentración de PC cerca de la superficie del cartílago (**Fig. 3**). La concentración PC alcanzó un máximo a una profundidad de aproximadamente $100 \mu\text{m}$, por debajo del cual, disminuyó. Por otro lado, en el cartílago lubricado con DMPC-SUV se produjo la mayor concentración PC profunda ($\sim 600 \mu\text{m}$) en el interior del cartílago, mientras que en la superficie la concentración PC era similar a la del control (cartílago lubricado con HB).

[0089] Morfología de cartílago: SEM se utilizó para estudiar la morfología de superficie de cartílago y desgaste²⁸. En la **Fig. 4** presentamos imágenes de SEM de las muestras de cartílago sometidas a diferentes tratamientos. Las dos muestras de control (**Fig. 4A** y **4B**) no fueron sometidas a ensayos de fricción, mientras que todas las demás muestras (**Fig. 4C-4F**) de cartílago se obtuvieron de las personas sanas y sometidas a ensayos de fricción idénticos en la presencia de diferentes lubricantes. **FIG. 4A** muestra el cartílago sano, donde las estructuras lipídicas globulares de anillo natural ocurren, se dispersan en su superficie porosa, como se muestra previamente en la superficie del cartílago de la rata por Ohno y compañeros^{28, 48}. Por otro lado, la superficie del cartílago artrósico carece de estas estructuras (**Fig. 4B**), al igual que el cartílago sano evaluado por fricción lubricado con solución salina (**Fig. 4C**) o ISF (**Fig. 4D**), lo que indica una mala protección contra el desgaste por estos lubricantes. En la superficie del cartílago lubricado con DMPC-SUV (**Fig. 4E**), muy pocas estructuras lipídicas se pueden notar después de la prueba de fricción. Con DMPC-MLV (**Fig. 4F**), grandes estructuras lipídicas, parecidas a las de cartílago sano, están presentes después de las pruebas de fricción.

References

[0090]

1. Alexander, C.J. Idiopathic osteoarthritis: time to change paradigms? *Skeletal Radiol.* 33, 321-324 (2004).
2. Corti, M.C. & Rigon, C. Epidemiology of osteoarthritis: prevalence, risk factors and functional impact. *Aging Clin. Exp. Res.* 15, 359-363 (2003).
3. Bullough, P.G. & Vigorita, V.J. *Orthopaedic Pathology*, Edn. 3^a. (Mosby-Wolfe, Baltimore; 1997).
4. Koopman, W.J. & Moreland, L.W. *Arthritis and Allied Conditions: A Textbook of Rheumatology*, Vol. 1-2, Edn. 15^a. (Lippincott Williams & Wilkins, Filadelfia; 2005).
5. Sokoloff, L. The biology of degenerative joint disease. *Acta Rheumatol Belg.* 1, 155-156 (1977).

6. Conaghan, P.G., Vanharanta, H. & Dieppe, P.A. Is progressive osteoarthritis an atheromatous vascular disease? *Ann. Rheum. Dis.* 64, 1539-1541 (2005).
7. Neame, R. & Doherty, M. Osteoarthritis update. *Clin. Med.* 5, 207-210 (2005).
8. Imhof, H. et al. Subchondral bone and cartilage disease: a rediscovered functional unit. *Invest. Radiol.* 35, 581-588 (2000).
9. Lajeunesse, D. & Reboul, P. Subchondral bone in osteoarthritis: a biologic link with articular cartilage leading to abnormal remodeling. *Curr. Opin. Rheumatol.* 15, 628-633 (2003).
10. Radin, E.L. Who gets osteoarthritis and why? *J. Rheumatol. Suppl.* 70, 10-15 (2004).
11. Grainger, R. & Cicuttini, F.M. Medical management of osteoarthritis of the knee and hip articulations. *Med. J. Aust.* 180, 232-236 (2004).
12. Swann, D.A., Hendren, R.B., Radin, E.L., Sotman, S.L. & Duda, E.A. The lubricating activity of synovial fluid glycoproteins. *Arthritis Rheum.* 24, 22-30 (1981).
13. Swann, D.A. & Mintz, G. The isolation and properties of a second glycoprotein (LGP-II) from the articular lubricating fraction from bovine synovial fluid. *Biochem. J.* 179, 465-471 (1979).
14. Swann, D.A., Slayter, H.S. & Silver, F.H. The molecular structure of lubricating glycoprotein-I, the boundary lubricant for articular cartilage. *J. Biol. Chem.* 256, 5921-5925 (1981).
15. Nitzan, D.W., Kreiner, B. & Zeltser, R. ATM lubrication system: its effect on the joint function, dysfunction, and treatment approach. *Compend. Contin. Educ. Dent.* 25, 437-444 (2004).
16. Yui, N., Okano, T. & Sakurai, Y. Inflammation responsive degradation of crosslinked hyaluronic acid gels. *J. Control. Release* 22, 105-116 (1992).
17. Hills, B.A. & Butler, B.D. Surfactants identified in synovial fluid and their ability to act as boundary lubricants. *Ann. Rheum. Dis.* 43, 641-648 (1984).
18. Sarma, A.V., Powell, G.L. & LaBerge, M. Phospholipid composition of articular cartilage boundary lubricant. *J. Orthop. Res.* 19, 671-676 (2001).
19. Schwarz, I.M. & Hills, B.A. Surface-active phospholipid as the lubricating component of lubricin. *Br. J. Rheumatol.* 37, 21-26 (1998).
20. Hills, B.A. & Monds, M.K. Enzymatic identification of the load-bearing boundary lubricant in the joint. *Br. J. Rheumatol.* 37, 137-142 (1998).
21. Ogston, A.G. & Stanier, J.E. Physiological function of hyaluronic acid in synovial fluid; viscous, elastic, and lubricant properties. *J. Physiol. (Cambridge)* 119, 244-252 (1953).
22. Benz, M., Chen, N. & Israelachvili, J. Lubrication and desgaste properties of grafted polyelectrolytes, hyaluronan and hylan, measured in the surface forces apparatus. *J. Biomed. Mater. Res. A.* 71, 6-15 (2004).
23. Rhee, D.K. et al. The secreted glycoprotein lubricin protects cartilage surfaces and inhibits synovial cell overgrowth. *J. Clin. Invest.* 115, 622-631 (2005).
24. Swann, D.A., Bloch, K.J., Swindell, D. & Shore, E. The lubricating activity of human synovial fluids. *Arthritis Rheum.* 27, 552-556 (1984).
25. Pickard, J.E., Fisher, J., Ingham, E. & Egan, J. Investigation into the effects of proteins and lipids on the frictional properties of articular cartilage. *Biomaterials* 19, 1807-1812 (1998).
26. Vecchio, P., Thomas, R. & Hills, B.A. Surfactant treatment for osteoarthritis. *Rheumatology (Oxford)* 38, 1020-1021 (1999).
27. Gudimelta, O.A., Crawford, R. & Hills, B.A. Consolidation responses of delipidized cartilage. *Clin. Biomech.* 19, 534-542 (2004).
28. Watanabe, M. et al. Ultrastructural study of upper surface layer in rat articular cartilage by "in vivo cryotechnique" combined with various treatments. *Med. Elect. Microsc.* 33, 16-24 (2000).

29. Kawano, T. et al. Mechanical effects of the intraarticular administration of high molecular weight hyaluronic acid plus phospholipid on synovial joint lubrication and prevention of articular cartilage degeneration in experimental osteoarthritis. *Arthritis Rheum.* 48, 1923-1929 (2003).
- 5 30. Forsey, R.W. et al. The effect of hyaluronic acid and phospholipid based lubricants on friction within a human cartilage damage model. *Biomaterials* 27, 4581-4590 (2006).
31. Klein, J. Molecular mechanisms of synovial joint lubrication. *J. Proc. Inst. Mech Eng., Part J: J. Eng. Tribology* 220, 691-710 (2006).
- 10 32. Briscoe, W.H. et al. Boundary lubrication under water. *Nature* 444, 191-194 (2006).
33. Raviv, U. et al. Lubrication by charged polymers. *Nature* 425, 163-165 (2003).
- 15 34. Barenholz, Y. & Cevc, G. Structure and properties of membranes in *Physical Chemistry of Biological Surfaces*. (Marcel Dekker, Nueva York; 2000).
35. Israelachvili, J., *Intermolecular and surface Forces*, 2^a edición,. Academic Press, London (1992)
- 20 36. Marsh, D. *CRC Handbook of Lipid Bicapas*. (CRC Press, Boca Raton, FL; 1990).
37. Barenholz, Y. & Amselem, S. Quality control assays in the development and clinical use of liposoma-based formulations in *Liposoma Technology*, Edn. 2^a. (CRC, Boca Raton, FL; 1993).
- 25 38. Shmeeda, H., Even-Chen, S. & Barenholz, Y. Enzymatic assays for quality control and pharmacokinetics of liposoma formulations: Comparison with nonenzymatic conventional methodologies. *Methods Enzymol.* 367, 272-292 (2003).
- 30 39. Garbuzenko, O., Barenholz, Y. & Prieve, A. Effect of grafted PEG on liposoma size and on compressibility and packing of lipid bicapa. *Chem. Phys. Lipids* 135, 117-129 (2005).
- 40 40. Merkhner, Y. et al. A rational human joint friction test using a human cartilage-on-cartilage arrangement. *Tribol. Lett.* 22, 29-36 (2006).
- 35 41. Barenholz, Y. Relevancy of drug loading to liposomal formulation therapeutic efficacy. *J. Liposoma Res.* 13, 1 (1993).
42. Bligh, E.G. & Dyer, W.J. A rapid method of total lipid extraction and purification. *Can. J. Biochem. Physiol.* 37, 911-917 (1959).
- 40 43. Biltonen, R.L. & Lichtenberg, D. The use of differential scanning calorimetry as a tool to characterize liposoma preparations. *Chem. Phys. Lipids* 64, 129-142 (1993).
44. Mouritsen, O.G. *Life As a Matter of Fat. The Emerging Science of Lipidomics*. (Springer-Verlag, Berlin; 2005).
- 45 45. Tirosh, O., Barenholz, Y., Katzhendler, J. & Prieve, A. Hydration of polyethylene glycol-grafted liposomes. *Biophys. J.* 74, 1371-1379 (1998).
46. Hills, B.A. Boundary lubrication in vivo. *J. Eng. Med.* 214, 83-94 (2000).
- 50 47. Mabrey, S. & Sturtevant, J.M. Investigation of phase transitions of lipids and lipid mixtures by high sensitivity differential scanning calorimetry. *PNAS* 73, 3862-3866 (1976).
48. Yoshida, M., Zea-Aragon, Z., Ohtsuki, K., Ohnishi, M. & Ohno, S. Ultrastructural study of upper surface layer in rat mandibular condylar cartilage by quick-freezing method. *Histol. Histopathol.* 19, 1033-1041 (2004).
- 55 49. Klein, J. Mechanism of friction across molecularly confined films of simple liquids. *Tribology Series* 36, 59-64 (1999).
- 50 50. Maroudas, A. Distribution and diffusion of solutes in articular cartilage. *Biophys. J.* 10, 365-379 (1970).
51. Stockwell, R.A. & Barnett, C.H. Changes in permeability of articular cartilage with age. *Nature* 201, 835-836 (1964).
- 60 52. Barnett, C.H. & Palfrey, A.J. Absorption into the rabbit articular cartilage. *J. Anat.* 99, 365-375 (1965).
- 65

53. Faure, C., Bonakdar, L. & Dufourc, E.J. Determination of DMPC hydration in the L(alpha) and L(beta') phases by ²H solid state NMR of D₂O. FEBS Lett. 405, 263-266 (1997).

54. Schrader, W. et al. Compressibility of lipid mixtures studied by calorimetry and ultrasonic velocity measurements. J. Phys. Chem. B 106, 6581-6586 (2002).

55. Schwarz, U.S., Komura, S. & Safran, S.A. Deformation and tribology of multi-walled hollow nanoparticles. Europhys. Lett. 50, 762-768 (2000).

56. Parasassi, T., Di Stefano, M., Loiero, M., Ravagnan, G. & Gratton, E. Cholesterol modifies water concentration and dynamics in phospholipid bilayers: a fluorescence study using Laurdan probe. Biophys J. 66, 763-768 (1994).

57. Oncins, G., Garcia-Manyes, S. & Sanz, F. Study of frictional properties of a phospholipid bicapa in a liquid environment with lateral force microscopy as a function of NaCl concentration. Langmuir 21, 7373-7349 (2005).

Reivindicaciones

1. Los liposomas que consisten en una o más membranas con al menos un fosfolípido (PL) seleccionado de entre el grupo que consiste en un glicerofosfolípido (GPL) que tiene dos, siendo el mismo o diferente, cadena de hidrocarburo C12-C16 y una esfingomielina (SM) que tiene una cadena de hidrocarburo C12-C18, las una o más membranas que tienen una temperatura de transición de fase en la que sólido ordenado (SO) a líquido desordenado (LD) se produce, estando la temperatura de transición de fase dentro de una temperatura de 20°C a 39°C, para su uso en el tratamiento de la disfunción de la articulación por la lubricación de articulaciones que tiene una temperatura de unión que está por encima de la temperatura de transición de fase.
2. El uso de liposomas que consisten en una o más membranas con al menos un fosfolípido (PL) seleccionado del grupo que consiste en glicerofosfolípido (GPL) que tiene dos, siendo las mismas o diferentes, cadenas de hidrocarburo C12-C16 y una esfingomielina (SM) que tiene una cadena de hidrocarburo C12-C18, las una o más membranas que tienen una temperatura de transición de fase en las que el sólido ordenado (SO) para líquido desordenado (LD) de transición de fase se produce, la temperatura de transición de fase está dentro de una temperatura de 20°C a 39°C, para su uso en la preparación de una composición farmacéutica para el tratamiento de disfunciones de la articulación de las articulaciones que tienen una temperatura conjunta por encima de dicha temperatura de transición de fase.
3. Los liposomas para uso de acuerdo con la reivindicación 1 o 2, en el que dichos GPL comprenden dos cadenas de acilo C 14 o C 16.
4. Los liposomas para su uso según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en el que al menos una de dichas cadenas de hidrocarburo es una cadena de hidrocarburo saturada.
5. Los liposomas para uso de acuerdo con la reivindicación 4, en el que las dos cadenas de hidrocarburos están saturadas.
6. Los liposomas para uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en el que dicha PL es una fosfatidilcolina (PC).
7. Los liposomas para uso de acuerdo con la reivindicación 6, en el que dicho PC se selecciona de dimiristoilfosfatidilcolina (DMPC), 1, 2-dipalmitoil-sn- glicero-3-fosfocolina (DPPC) y la combinación de los mismos.
8. Los liposomas para uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, en donde dichos liposomas son vesículos multilamelares (MLV).
9. Los liposomas para uso de acuerdo con la reivindicación 8, en el que los liposomas tienen un diámetro medio de entre aproximadamente 0,3 µm a aproximadamente 5 µm.
10. Los liposomas para su uso según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, en el que el grupo de cabeza de PL se compleja con al menos 6 moléculas de agua por grupo de cabeza.
11. Los liposomas para su uso según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10, en el que la temperatura conjunta es 1- 15°C por encima de dicha temperatura de transición de fase.
12. Los liposomas para su uso según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 11, en el que los liposomas se formulan para inyección intraarticular, la administración artroscópica o para la administración quirúrgica.
13. Los liposomas para su uso según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 12, siendo para el tratamiento de un trastorno articular o síntomas derivados de los mismos.
14. Los liposomas para su uso de acuerdo con la reivindicación 13, en el que el trastorno articular se selecciona de artritis, osteoartritis, osteoartritis en pacientes de artritis reumatoide, lesión articular traumática, articulación bloqueada, lesión deportiva, estado post artrocentesis, cirugía artroscópica, cirugía de articulación abierta, y el reemplazo de la articulación.

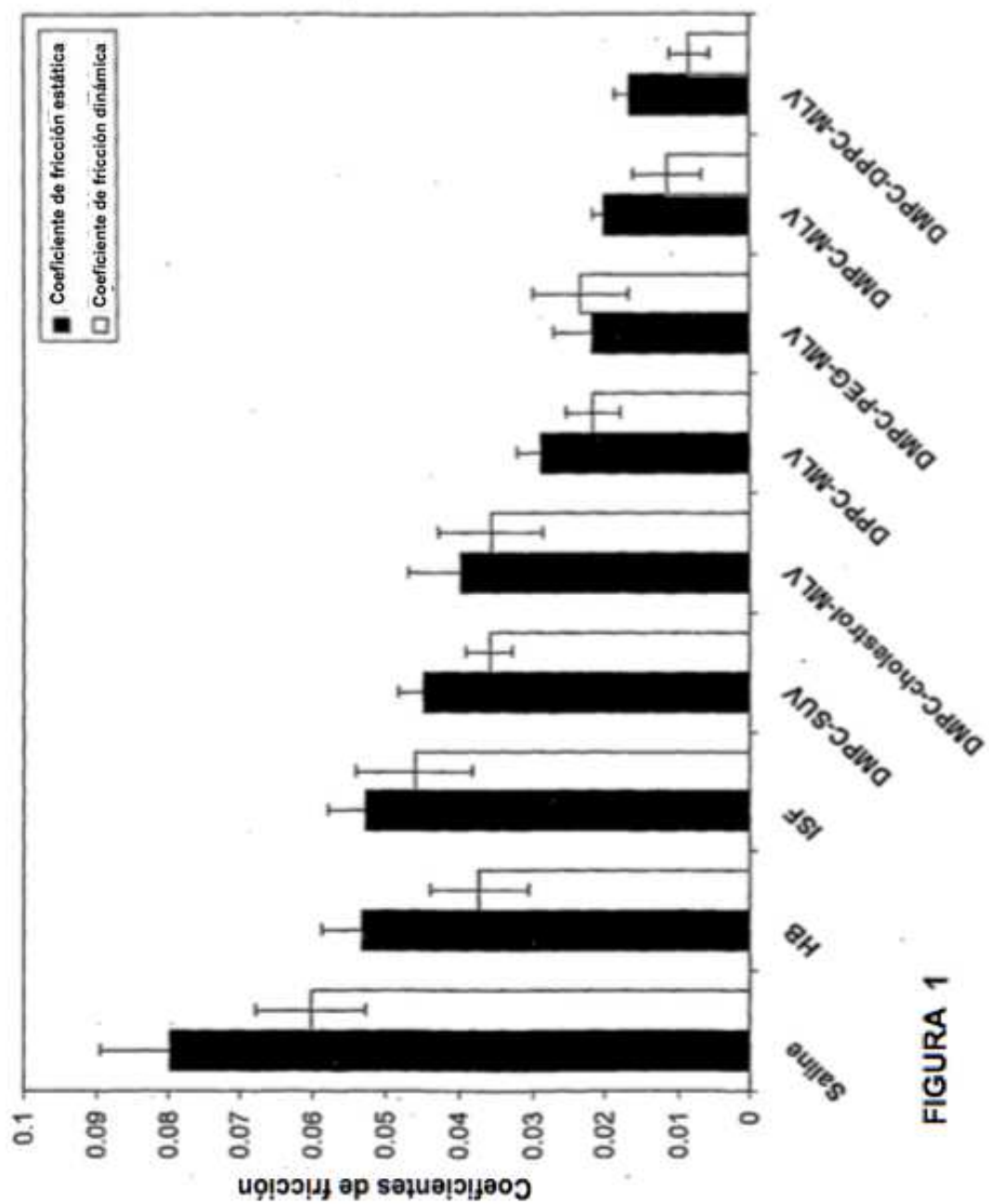


FIGURA 1

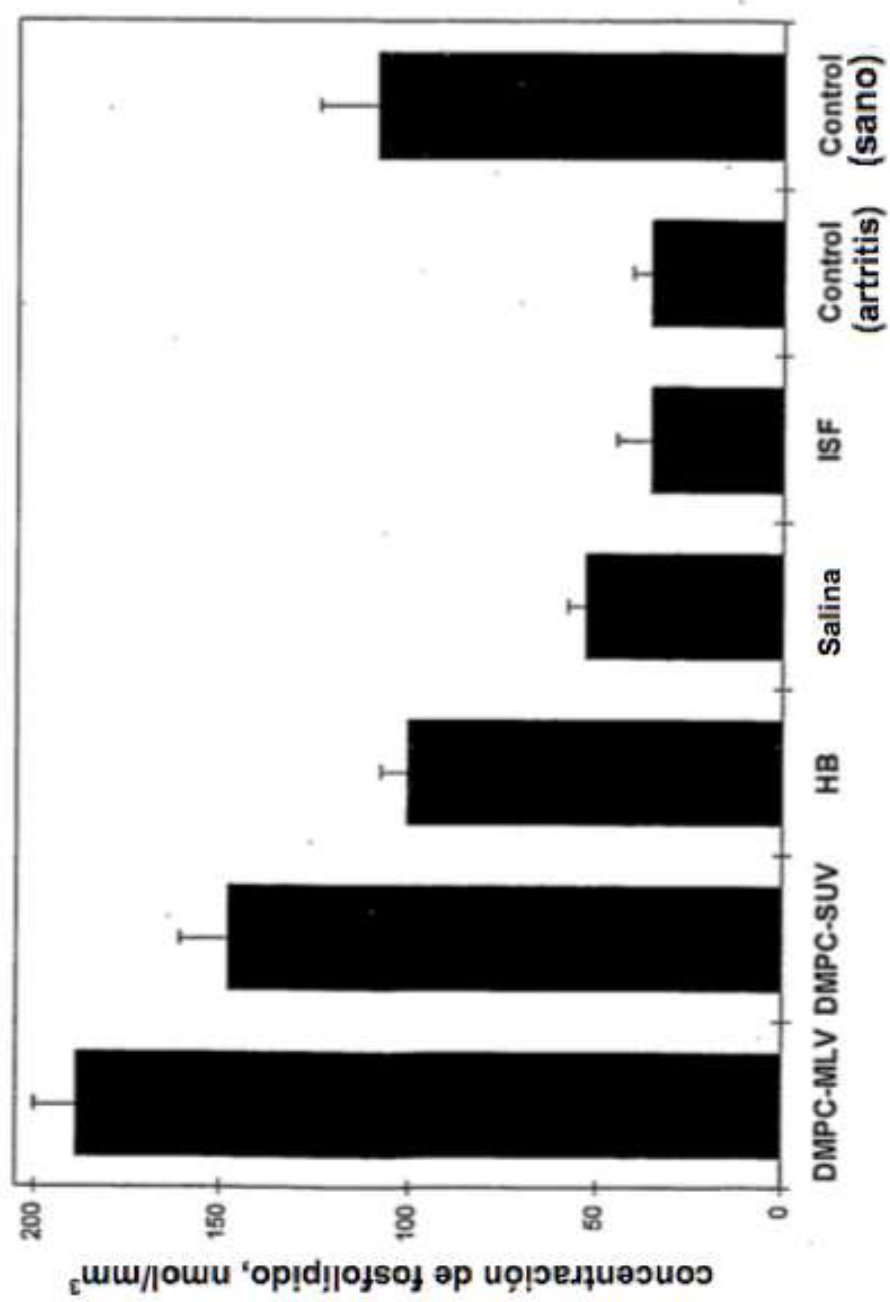


FIGURA 2

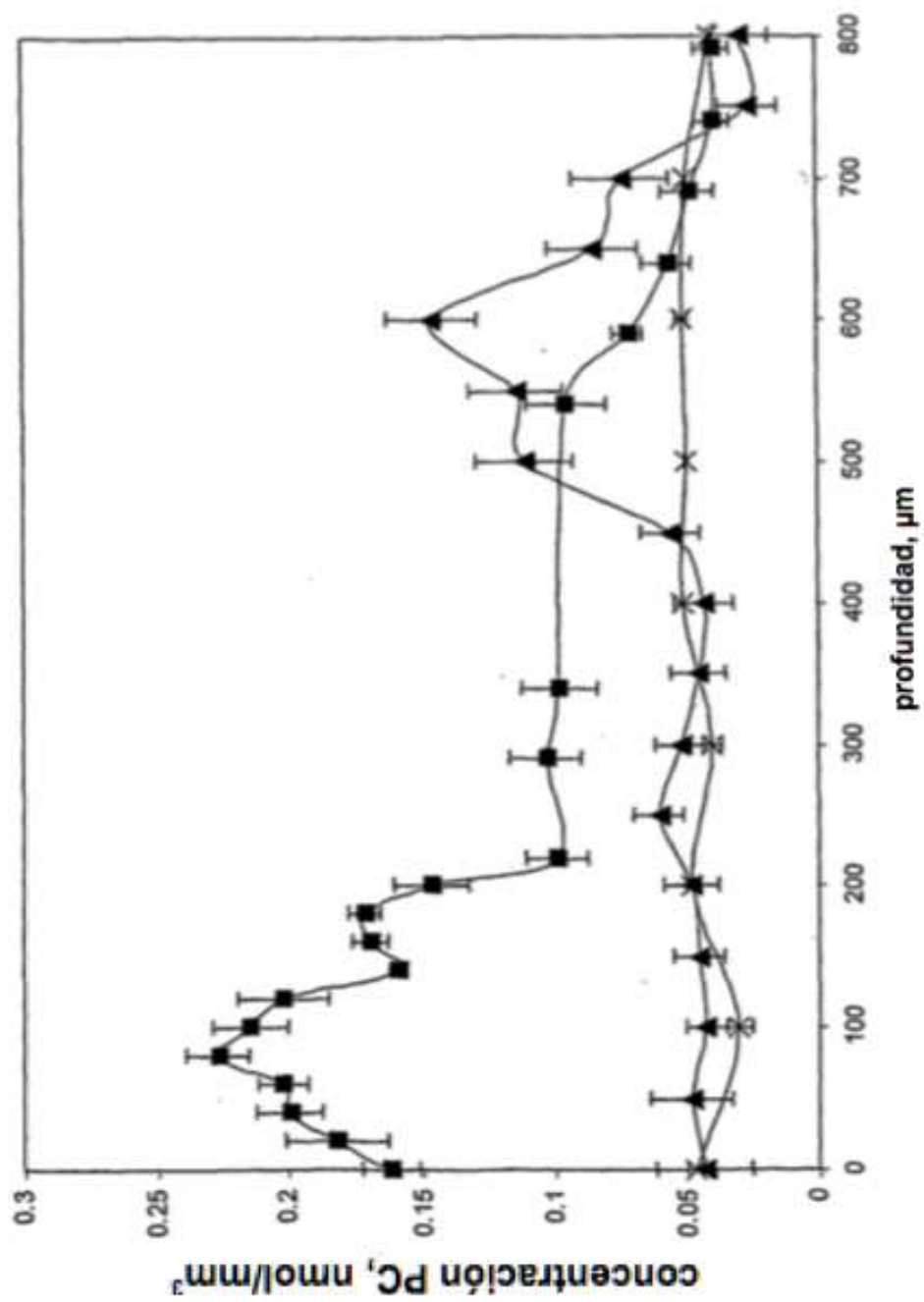


FIGURA 3

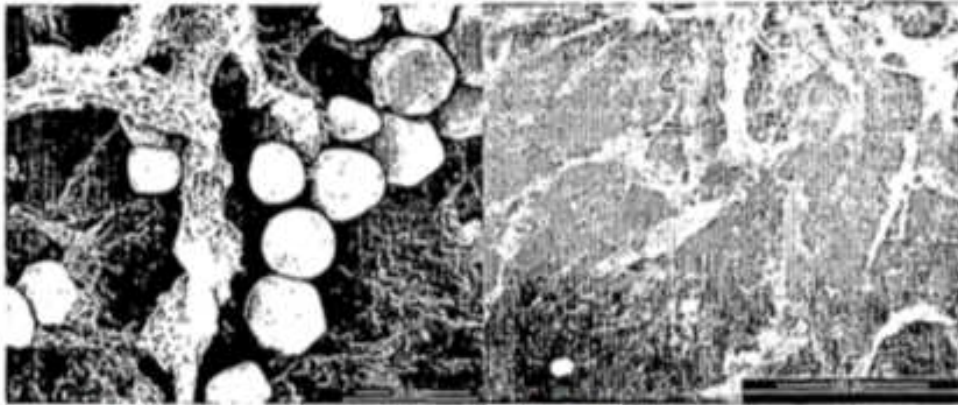


FIGURA 4A

FIGURA 4B

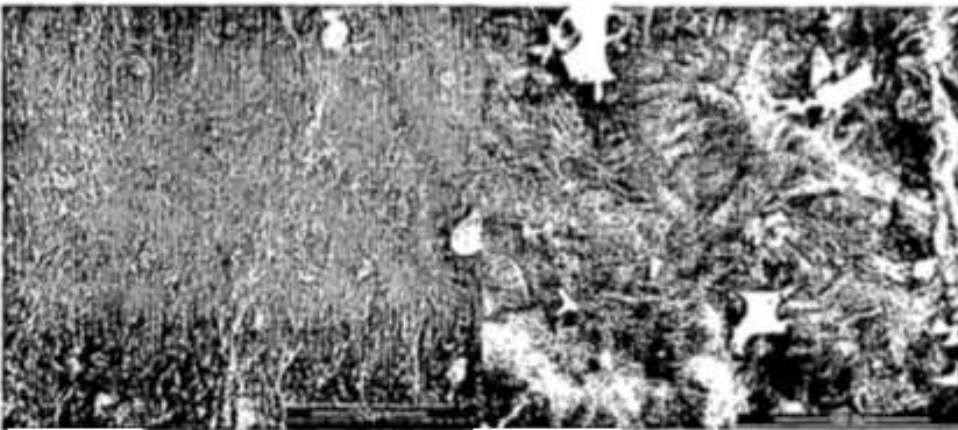


FIGURA 4C

FIGURA 4D

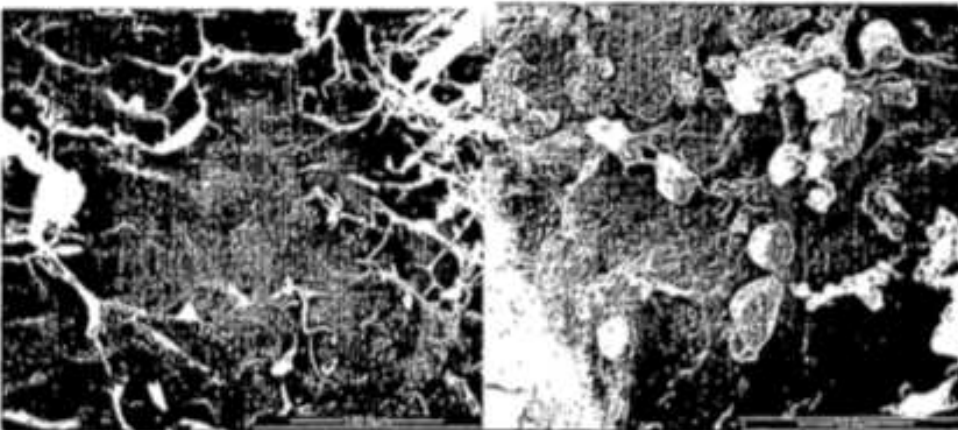


FIGURA 4E

FIGURA 4F