

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 634 008**

51 Int. Cl.:

A61K 31/662 (2006.01)

A61P 19/02 (2006.01)

A61P 29/00 (2006.01)

A61K 31/661 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **12.10.2012** **PCT/JP2012/076478**

87 Fecha y número de publicación internacional: **16.05.2013** **WO13069404**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **12.10.2012** **E 12847890 (6)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **19.04.2017** **EP 2803359**

54 Título: **Agente terapéutico para la artrosis**

30 Prioridad:

11.11.2011 JP 2011247047

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
26.09.2017

73 Titular/es:

SANSHO CO. LTD. (100.0%)
3rd Floor, Toyo Bldg. 1-2-10, Nihonbashi Chuo-ku
Tokyo 103-0027, JP

72 Inventor/es:

MUROFUSHI KIMIKO;
MASUDA IKUKO y
MOROHOSHI TOSHIRO

74 Agente/Representante:

VALLEJO LÓPEZ, Juan Pedro

ES 2 634 008 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

Agente terapéutico para la artrosis

Campo técnico

La presente invención refiere a un agente terapéutico para la artrosis que comprende, como principio activo, ácido fosfatídico cíclico o ácido fosfatídico carbacíclico.

Antecedentes de la técnica

La artrosis tiene distintos subtipos, tales como la osteoartritis, el reumatismo articular y la fiebre reumática, y la cantidad de pacientes que padecen osteoartritis y reumatismo articular es particularmente grande. En vista de ello, la osteoartritis y el reumatismo articular se consideran subtipos de artritis de gran importancia. La osteoartritis se clasifica en osteoartritis congénita o secundaria, y osteoartritis primaria, causada por la deformación del cartílago articular a causa del envejecimiento. La cantidad de pacientes que padecen osteoartritis primaria aumenta conforme aumenta la población anciana. Aunque existen diferencias considerables entre la osteoartritis y el reumatismo articular en términos de sus causas y condiciones clínicas, estas enfermedades tienen en común que la función articular se deteriora a causa de la destrucción del cartílago articular en el extremo. Hasta la fecha, ciertos agentes analgésicos antiinflamatorios, como la aspirina y la indometacina, se han usado como agentes terapéuticos para las enfermedades reumáticas, tales como la osteoartritis. Sin embargo, tales agentes analgésicos antiinflamatorios no tienen efectos inhibitorios de la destrucción del cartílago articular. Por otra parte, no se ha confirmado en entornos clínicos que los agentes terapéuticos tales como los preparados de oro, los agentes inmunosupresores y los preparados de esteroides tengan efectos inhibitorios de la destrucción del cartílago articular.

El cartílago articular está compuesto de condrocitos y matrices cartilaginosas. Las matrices cartilaginosas tienen una estructura tridimensional complicada formada por colágenos —que son proteínas fibrosas producidas por los condrocitos— y proteoglicanos (complejos proteína-polisacárido) unidos a ácidos hialurónicos. La función articular normal se mantiene con retención de gran cantidad de agua en las matrices cartilaginosas.

Además de los agentes terapéuticos para la osteoartritis descritos anteriormente, se ha utilizado en entornos clínicos la inyección intraarticular de ácido hialurónico, que ha demostrado tener efectos protectores y reparadores del cartílago articular, así como efectos lubricantes sobre las articulaciones. Sin embargo, esta técnica es invasiva y, por lo tanto, no resulta satisfactoria desde el punto de vista de la calidad de vida del paciente.

El documento JP 2010189315 describe que el ácido fosfatídico tiene un efecto curativo sobre las lesiones del cartílago articular.

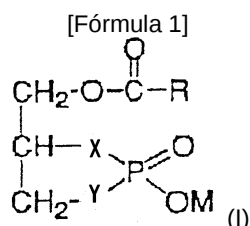
Resumen de la invención

Objeto previsto de la invención

Un objeto de la presente invención es proveer un agente terapéutico para la artrosis que ejerza efectos inhibitorios de la destrucción del cartílago articular y efectos terapéuticos elevados contra la artrosis. Medios para alcanzar el objeto

Los inventores de la presente consideraron que acelerar la producción de ácido hialurónico en los condrocitos de las articulaciones podría inhibir la destrucción del cartílago articular y funcionar como un medio terapéutico efectivo para la osteoartritis. Los inventores realizaron estudios concentrados y descubrieron que los ácidos fosfatídicos cíclicos y derivados de los mismos aceleraban significativamente la producción de ácido hialurónico en condrocitos derivados de pacientes con osteoartritis, y que tales efectos se observaban en modelos animales de la enfermedad. Esto llevó a la realización de la presente invención.

Así, la presente invención provee un agente terapéutico para la artrosis que comprende, como principio activo, un compuesto representado por la Fórmula (I):



donde R representa un grupo alquilo lineal o ramificado con 1 a 30 átomos de carbono, un grupo alquenilo lineal o ramificado con 2 a 30 átomos de carbono, o un grupo alquinilo lineal o ramificado con 2 a 30 átomos de carbono,

que pueden contener un anillo cicloalcánico o aromático; X e Y representan, cada una independientemente de la otra, un átomo de oxígeno o un grupo metileno, con la salvedad de que X e Y no representen simultáneamente un grupo metileno; y M representa un átomo de hidrógeno o un átomo de un metal alcalino.

- 5 Preferentemente, en la Fórmula (I), X e Y representan un átomo de oxígeno.

Preferentemente, en la Fórmula (I), una de las letras X o Y representa un átomo de oxígeno y la otra un grupo metileno.

- 10 Preferentemente, el compuesto representado por la Fórmula (I) es el ácido fosfatídico carbacíclico de ácido fosfatídico cíclico 1-oleilo o ácido fosfatídico cíclico 1-palmitoleilo.

Efectos de la invención

- 15 La presente invención puede proveer un agente terapéutico para la artrosis que inhibe la destrucción del cartílago articular y tiene efectos terapéuticos elevados contra la artrosis.

Breve descripción de los dibujos

- 20 [Fig. 1]La Fig. 1 muestra los resultados de un examen de los efectos de un derivado del ácido fosfatídico cíclico sobre la expresión del gen de la sintasa del ácido hialurónico (HAS1) en condrocitos derivados de un paciente con osteoartritis.
[Fig. 2]La Fig. 2 muestra los resultados de un examen de los efectos de un derivado del ácido fosfatídico cíclico sobre la expresión del gen de la sintasa del ácido hialurónico (HAS2) en condrocitos derivados de un paciente con osteoartritis.
25 [Fig. 3]La Fig. 3 muestra los resultados de un examen de los efectos de un derivado del ácido fosfatídico cíclico sobre la expresión del gen de la sintasa del ácido hialurónico (HAS3) en condrocitos derivados de un paciente con osteoartritis.
[Fig. 4]La Fig. 4 muestra los resultados de un examen de los efectos de un derivado del ácido fosfatídico cíclico sobre la expresión del gen de la hialuronidasa (HYAL1) en condrocitos derivados de un paciente con osteoartritis.
30 [Fig. 5]La Fig. 5 muestra los resultados de un examen de los efectos de un derivado del ácido fosfatídico cíclico sobre la expresión del gen de la hialuronidasa (HYAL2) en condrocitos derivados de un paciente con osteoartritis.
[Fig. 6]La Fig. 6 muestra los resultados de un examen de los efectos de un derivado del ácido fosfatídico cíclico sobre la producción de ácido hialurónico en condrocitos derivados de un paciente con osteoartritis.
35 [Fig. 7]La Fig. 7 muestra los resultados de un examen de los efectos de un derivado del ácido fosfatídico cíclico (compuesto de prueba: ScPA) sobre la expresión de los genes de la sintasa del ácido hialurónico (HAS1, HAS2 y HAS3) en sinoviocitos derivados de un paciente con osteoartritis.
[Fig. 8]La Fig. 8 muestra los resultados de un examen los efectos de un derivado del ácido fosfatídico cíclico sobre la expresión de los genes de la hialuronidasa (HYAL1 y HYAL2) en sinoviocitos derivados de un paciente con osteoartritis.
40 [Fig. 9]La Fig. 9 muestra los cambios en la evaluación del dolor (distribución del peso entre ambas extremidades posteriores). Media $\pm$ error estándar, n = 6; en comparación con el grupo 1 (el grupo al que se le administró el vehículo) *,**; niveles de significación con $p < 0,05$ y $p < 0,01$ (prueba t de Student y prueba t de Aspin-Welch).
[Fig. 10] La Fig. 10 muestra los resultados de una evaluación de inflamación (inflamación articular de ambas extremidades posteriores). Media $\pm$ error estándar, n = 6; en comparación con el grupo 1 (el grupo al que se le administró el vehículo) *,**; niveles de significación con $p < 0,05$ y $p < 0,01$ (prueba t de Student y prueba t de Aspin-Welch).
[Fig. 11] La Fig. 11 muestra los índices histopatológicos del cóndilo femoral y los de la tibia.
[Fig. 12] La Fig. 12 muestra imágenes histopatológicas de ejemplos representativos. La Imagen A muestra el grupo al que se le administró el vehículo (Animal n.º 101), donde se observa desorganización de los condrocitos (que se indica con una flecha) y formación de cúmulos (que se indica con una flecha) en el cartílago de la articulación (aspecto medial del fémur derecho, tinción HE, aumento x200). La Imagen B muestra el grupo al que se le administró la sustancia bajo estudio (Animal n.º 201), donde se observa una erosión (leve) del cartílago de la articulación (aspecto medial del fémur derecho, tinción HE, aumento x200). La Imagen C muestra el grupo al que se le administró el vehículo (Animal n.º 101), donde se observa una tincionabilidad (levemente) menor en el cartílago de la articulación (aspecto medial del fémur derecho, tinción SO, aumento x200). La Imagen D muestra el grupo al que se le administró la sustancia de prueba (Animal n.º 201), donde no se observa un cambio en el cartílago de la articulación (aspecto medial del fémur derecho, tinción SO, aumento x200).

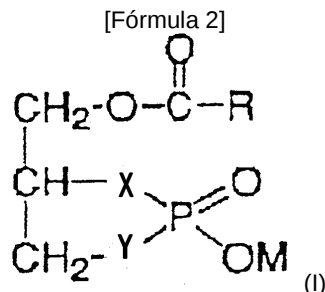
60 Realizaciones de la invención

En lo sucesivo, se describe en mayor detalle la presente invención.

- 65 El agente terapéutico para la artrosis que se describe en la presente invención se puede usar para el tratamiento de distintos subtipos de artrosis, como la osteoartritis, el reumatismo articular y la fiebre reumática (en particular la osteoartritis). Tal agente comprende, como principio activo, ácido fosfatídico cíclico, ácido fosfatídico carbacíclico o

una sal de los mismos. Cualquier compuesto se puede usar como ácido fosfatídico cíclico, ácido fosfatídico carbáclico o sal de los mismos, sin ninguna limitación particular, siempre y cuando dicho compuesto exhiba los efectos de la presente invención. Los ejemplos preferentes incluyen los compuestos representados por la Fórmula (I) a continuación:

5



donde R representa un grupo alquilo lineal o ramificado con 1 a 30 átomos de carbono, un grupo alqueno lineal o ramificado con 2 a 30 átomos de carbono, o un grupo alquinilo lineal o ramificado con 2 a 30 átomos de carbono, que pueden contener un anillo cicloalcanico o aromático; X e Y representan, cada una independientemente de la otra, un átomo de oxígeno o un grupo metileno, con la salvedad de que X e Y no representen simultáneamente un grupo metileno; y M representa un átomo de hidrógeno o un átomo de un metal alcalino.

En la Fórmula (I), algunos ejemplos específicos de un grupo alquilo lineal o ramificado con 1 a 30 átomos de carbono representado por el sustituyente R son un grupo metilo, un grupo etilo, un grupo propilo, un grupo butilo, un grupo pentilo, un grupo hexilo, un grupo heptilo, un grupo octilo, un grupo nonilo, un grupo decilo, un grupo undecilo, un grupo dodecilo, un grupo tridecilo, un grupo tetradecilo, un grupo pentadecilo, un grupo hexadecilo, un grupo heptadecilo, un grupo octadecilo, un grupo nonadecilo y un grupo eicosilo.

Algunos ejemplos específicos de grupos alqueno lineales o ramificados con 2 a 30 átomos de carbono representados por el sustituyente R incluyen un grupo alilo, un grupo butenilo, un grupo octenilo, un grupo decenilo, un grupo dodecadienilo y un grupo hexadecatrienilo. Algunos ejemplos más específicos de los mismos son un grupo 8-decenilo, un grupo 8-undecenilo, un grupo 8-dodecenilo, un grupo 8-tridecenilo, un grupo 8-tetradecenilo, un grupo 8-pentadecenilo, un grupo 8-hexadecenilo, un grupo 8-heptadecenilo, un grupo 8-octadecenilo, un grupo 8-icosenilo, un grupo 8-docosenilo, un grupo heptadeca-8,11-dienilo, un grupo heptadeca-8,11,14-trienilo, un grupo nonadeca-4,7,10,13-tetraenilo, un grupo nonadeca-4,7,10,13,16-pentenilo y un grupo henicosa-3,6,9,12,15,18-hexenilo.

Algunos ejemplos específicos de grupos alquilo lineales o ramificados con 2 a 30 átomos de carbono representados por el sustituyente R incluyen un grupo 8-decilo, un grupo 8-undecilo, un grupo 8-dodecilo, un grupo 8-tridecilo, un grupo 8-tetradecilo, un grupo 8-pentadecilo, un grupo 8-hexadecilo, un grupo 8-heptadecilo, un grupo 8-octadecilo, un grupo 8-icosilo, un grupo 8-docosilo y un grupo heptadeca-8,11-diilo.

Algunos ejemplos del anillo cicloalcánico, que puede formar parte del grupo alquilo, alquenilo o alquinilo descrito anteriormente, son un anillo ciclopropanico, un anillo ciclobutánico, un anillo ciclopentánico, un anillo ciclohexánico y un anillo ciclooctánico. El anillo cicloalcánico puede contener uno o más heteroátomos, algunos ejemplos de los cuales son un anillo oxilánico, un anillo oxetánico, un anillo tetrahidrofuranico y un anillo N-metilprolidínico.

Algunos ejemplos del anillo aromático, que puede formar parte del grupo alquilo, alquenilo o alquinilo descrito anteriormente, son un anillo bencénico, un anillo naftalénico, un anillo piridínico, un anillo furánico y un anillo tiofénico.

Algunos ejemplos específicos para el caso en el que el sustituyente R es un grupo alquilo sustituido con un anillo cicloalcanico son un grupo ciclopropilmetilo, un grupo ciclohexilmetilo y un grupo 8.9-metanopentadecilo.

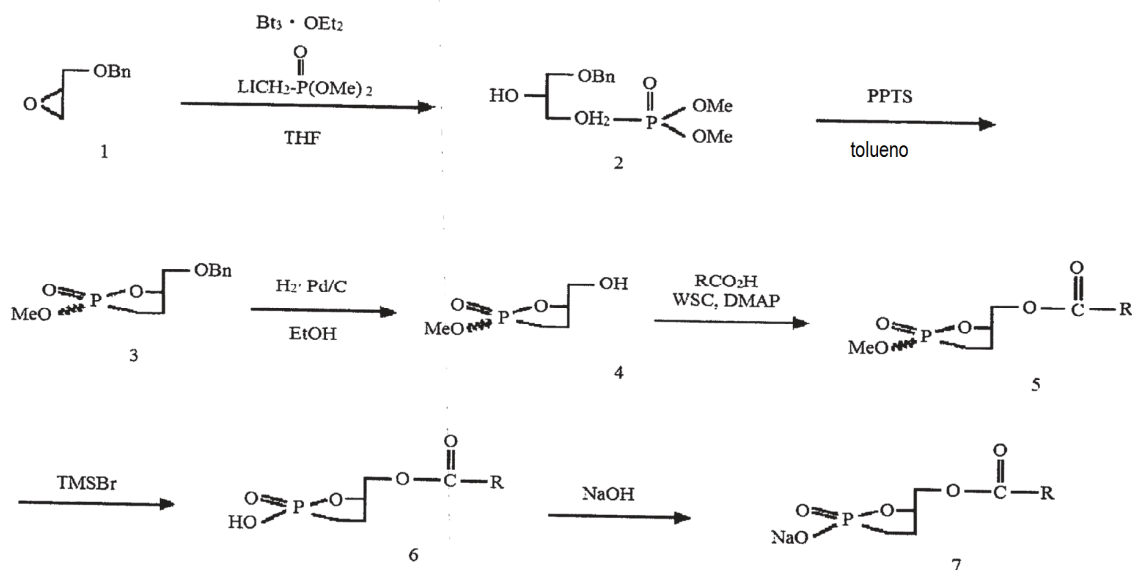
Algunos ejemplos específicos para el caso en el que el sustituyente R es un grupo alquilo sustituido con un anillo aromático son un grupo bencilo, un grupo fenetilo y un grupo p-pentilfeniloctilo.

Preferentemente, R representa un grupo alquilo lineal o ramificado con 9 a 17 átomos de carbono, un grupo alquenilo lineal o ramificado con 9 a 17 átomos de carbono, o un grupo alquinilo lineal o ramificado con 9 a 17 átomos de carbono. Más preferentemente, R representa un grupo alquilo lineal o ramificado con 9, 11, 13, 15 o 17 átomos de carbono, o un grupo alquenilo lineal o ramificado con 9, 11, 13, 15 o 17 átomos de carbono. Con particular preferencia, R representa un grupo alquenilo lineal o ramificado con 9, 11, 13, 15 o 17 átomos de carbono.

En el compuesto representado por la Fórmula (I), X e Y representan, cada una independientemente de la otra, un átomo de oxígeno (-O-) o un grupo metileno (-CH₂-), con la salvedad de que X e Y no representen simultáneamente un grupo metileno. Es decir, las combinaciones de X e Y incluyen los tres patrones siguientes:

- (1) X representa un átomo de oxígeno e Y representa un átomo de oxígeno;
- (2) X representa un átomo de oxígeno e Y representa un grupo metileno; o
- (3) X representa un grupo metileno e Y representa un átomo de oxígeno.

- 5 En el derivado del ácido fosfatídico cíclico representado por la Fórmula (I), M representa un átomo de hidrógeno o un átomo de un metal alcalino. Algunos ejemplos de átomos de metales alcalinos son el litio, el sodio y el potasio, con particular preferencia por el sodio.
- 10 Específicamente, el compuesto representado por la Fórmula (I) de la presente invención es, con particular preferencia, un derivado del ácido fosfatídico cíclico o del ácido fosfatídico carbacíclico que tiene, como grupo acrílico en la posición 1, un grupo oleilo en el que el sustituyente R representa un grupo alquénico con 17 átomos de carbono (abreviado "C18:1") o un grupo palmitoleilo en el que el sustituyente R representa un grupo alquénico con 15 átomos de carbono (abreviado "C16:1").
- 15 El compuesto representado por la Fórmula (I) puede comprender un isómero, como un isómero posicional, un isómero geométrico, un tautómero o un isómero óptico, de acuerdo con el tipo de un sustituyente del mismo. Todos los posibles isómeros, así como las mezclas que comprenden dos o más tipos de tales isómeros en determinada proporción, están dentro del alcance de la presente invención.
- 20 Adicionalmente, el compuesto representado por la Fórmula (I) puede tomar la forma de un aducto compuesto por el compuesto y agua o distintos tipos de solventes (hidratos o solvatos). Tal aducto también está dentro del alcance de la presente invención. Asimismo, está dentro del alcance de la presente invención toda forma cristalina del compuesto representado por la Fórmula (I) y las sales del mismo.
- 25 Un compuesto representado por la Fórmula (I) en el que tanto X como Y representan átomos de oxígeno se puede sintetizar químicamente de acuerdo con el método que se describe, por ejemplo, en las Publicaciones de Patentes Japonesas (Kokai) n.º H05-230088 A (1993), H07-149772 A (1995), H07-258278 A (1995) o H09-25235 A (1997).
- 30 Asimismo, un compuesto representado por la Fórmula (I) en el que tanto X como Y representan átomos de oxígeno se puede sintetizar de acuerdo con el método que se describe en la Publicación de Patente Japonesa (Kokai) n.º 2001-178489 A mediante la reacción de fosfolipasa D con un lisofosfolípido. El lisofosfolípido que se usa aquí no se limita particularmente, siempre y cuando sea capaz de reaccionar con la fosfolipasa D. Se conocen muchos tipos de lisofosfolípidos, incluidas especies moleculares con distintos tipos de ácidos grasos o que tienen enlaces éter o vinil éter, y tales lisofosfolípidos están disponibles comercialmente. En lo que respecta a la fosfolipasa D, los tipos
- 35 derivados de plantas superiores como el repollo o el maní, o aquellos derivados de microorganismos como *Streptomyces chromofuscus* o *Actinomyces* *sp.*, están disponibles comercialmente como reactivos, aunque una enzima derivada de la cepa n.º 362 de *Actinomyces* *sp.* sintetiza un ácido fosfatídico cíclico de manera muy selectiva (Publicación de Patente Japonesa [Kokai] n.º H11-367032 A [1999]). La reacción entre el lisofosfolípido y la fosfolipasa D se puede realizar en cualquier condición siempre que la enzima sea capaz de ejercer su actividad. Por
- 40 ejemplo, la reacción se puede realizar en una solución tampón de acetato con cloruro de calcio (pH: aprox. 5 a 6) a temperatura ambiente o superior (preferentemente 37 °C) durante 1 a 5 horas. El derivado de ácido fosfatídico cíclico resultante se puede purificar de acuerdo con una técnica convencional mediante, por ejemplo, extracción, cromatografía en columna o cromatografía en capa fina (TLC).
- 45 Un compuesto representado por la Fórmula (I) en el que X representa un átomo de oxígeno e Y representa un grupo metileno se puede sintetizar de acuerdo con el método descrito en la literatura (Kobayashi, S. et al., Tetrahedron Letters, 34, 4047-4050, 1993) o en el documento WO 2002/094286. A continuación se muestra un ejemplo de una vía de síntesis específica.



En las fórmulas anteriores, se comienza con (R)-bencil glicidil éter disponible comercialmente (1) activado con la ayuda de $\text{BF}_3 \cdot \text{Et}_2\text{O}$, se hace reaccionar n-BuLi con dimetil metilfosfonato, y la forma litiada resultante se somete a la reacción para obtener un alcohol (2).

El alcohol resultante se somete a una reacción en tolueno con exceso de una sal piridínica de ácido p-toluenosulfónico a 80°C para obtener una forma cíclica (3). La forma cíclica resultante se hidroliza en una atmósfera de hidrógeno con $\text{Pd(OH)}_2\text{-C}$ al 20 % para producir desbencilación (4). Se hace reaccionar clorhidrato de 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)carbodiimida, como condensador, con un ácido graso para obtener una forma acoplada (5). A continuación, se usa bromotrimetilsilano como nucleófilo para eliminar exclusivamente un grupo metilo en forma posicionalmente selectiva, con lo que se obtiene un ácido fosfónico cíclico (6). El resultado se introduce en un embudo de decantación con la ayuda de éter y se agrega, por gotas, una pequeña cantidad de una solución acuosa de hidróxido de sodio 0,02 N para separar los líquidos. El compuesto de interés se extrae y purifica en forma de sal sódica (7).

Un compuesto representado por la Fórmula (I) en el que X representa un grupo metileno e Y representa un átomo de oxígeno se puede sintetizar de acuerdo con el método que se describe en la Publicación de Patente Japonesa (Kokai) n.º 2004-010582 A o la Publicación Internacional WO 2003/104246.

El agente terapéutico para la artrosis que se describe en la presente invención se provee, preferentemente, en forma de un compuesto farmacéutico que comprende uno o más aditivos farmacéuticamente aceptables y el compuesto representado por la Fórmula (I) como principio activo.

El agente terapéutico para la artrosis que se describe en la presente invención se puede administrar en diversas formas, y la administración puede realizarse oralmente o parenteralmente (por ejemplo, se puede emplear inyección intravenosa, intramuscular, subcutánea o intracutánea, administración rectal o administración per mucosa). Algunos ejemplos de formas farmacéuticas adecuadas para la administración oral son un comprimido, un gránulo, una cápsula, un polvo, una solución, una suspensión o un jarabe. Algunos ejemplos de formas farmacéuticas adecuadas para la administración parenteral son una inyección, una infusión, un supositorio y un agente de absorción percutánea. La forma farmacéutica del agente de la presente invención no se limita a las anteriores. Adicionalmente, se pueden crear formulaciones de liberación prolongada del agente de acuerdo con los métodos conocidos en la técnica.

Los tipos de aditivos farmacéuticos que se utilizan para producir el agente terapéutico para la artrosis de la presente invención no se limitan particularmente, y una persona versada en la técnica puede seleccionar aditivos adecuados. Algunos ejemplos de los aditivos que se pueden usar incluyen un excipiente, un agente desintegrante o un agente desintegrante auxiliar, un aglutinante, un lubricante, un agente de recubrimiento, una base, un agente disolvente o un solubilizante, un dispersante, un agente de suspensión, un emulsionante, una solución tampón, un antioxidante, un antiséptico, un agente isotónico, un agente ajustador del pH, un agente disolvente y un estabilizador. Cada uno de los ingredientes específicos que se usan para los fines anteriores es familiar para una persona versada en la técnica.

Algunos ejemplos de aditivos farmacéuticos que se pueden usar para la producción de preparados orales son: un excipiente, como glucosa, lactosa, D-manitol, almidón o celulosa cristalina; un agente desintegrante o un agente

desintegrante auxiliar, como carboximetilcelulosa, almidón o carboximetilcelulosa cálcica; un aglutinante, como hidroxipropilcelulosa, hidroxipropilmetilcelulosa, polivinilpirrolidona o gelatina; un lubricante, como estearato de magnesio o talco; un agente de recubrimiento, como hidroxipropilmetilcelulosa, azúcar blanca, polietilenglicol u óxido de titanio; y una base, como vaselina, parafina líquida, polietilenglicol, gelatina, caolín, glicerina, agua purificada o grasa dura.

Algunos ejemplos de los aditivos farmacéuticos que se pueden usar para la producción de una inyección o una infusión son: un agente disolvente o un solubilizante que se pueden usar para una inyección acuosa o una inyección de disolución al momento del uso, tales como agua destilada para inyecciones, suero fisiológico, propilenglicol o un tensoactivo; un agente isotónico, tal como glucosa, cloruro de sodio, D-manitol o glicerina; y un agente ajustador del pH, tal como un ácido inorgánico, un ácido orgánico, una base inorgánica o una base orgánica.

El agente terapéutico para la artrosis que se describe en la presente invención se puede administrar a mamíferos, incluidos los seres humanos.

La dosis del agente terapéutico para la artrosis que se describe en la presente invención se debe aumentar o disminuir en función de condiciones como la edad, el sexo, el peso corporal, los síntomas del paciente y la vía de administración. La dosis del principio activo por día por adulto generalmente está entre 1 g/kg y 1000 mg/kg, y, preferentemente, entre 10 g/kg y 100 mg/kg. El agente se puede administrar en las cantidades mencionadas anteriormente una vez al día o en varias oportunidades a lo largo del día (por ejemplo, unas 2 a 4 veces).

La presente invención se describe en mayor detalle con referencia a los siguientes ejemplos, pero la presente invención no se limita a los ejemplos.

Ejemplos

Ejemplo 1

(1) Método

(1-1) Cultivo de condrocitos y sinoviocitos articulares

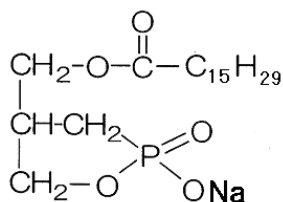
Se utilizó cartílago hialino articular que se tomó de un paciente con osteoartritis de rodilla al momento del reemplazo de la articulación de su rodilla por una articulación artificial. Los trozos de cartílago articular se lavaron y se sometieron a un tratamiento enzimático con pronasa y collagenasa para descomponer las matrices cartilaginosas. A continuación, se tomaron muestras de las células, que se cultivaron y se criopreservaron. También se tomaron muestras de sinoviocitos. En este ejemplo, se usaron tales sinoviocitos y condrocitos articulares obtenidos de un paciente con osteoartritis. Estas células se sometieron a cultivo en monocapa de alta densidad para evitar la transformación y, a continuación, las células cultivadas se sometieron al experimento. Como medio de cultivo se usó inicialmente medio de Eagle modificado por Dulbecco (DMEM) suplementado con 10 % de suero fetal bovino (FBS) y 1 % de antibióticos/antifúngicos. El medio se reemplazó con un medio sin suero al alcanzar la confluencia y, luego, se inició el experimento.

(1-2) Adición de ácido fosfatídico cíclico o ácido fosfatídico carbacíclico (cPA)

Como ácido fosfatídico cíclico y ácido fosfatídico carbacíclico se usaron, respectivamente, C16:1-cPA (cPA) y cPA nativo (NcPA), y estas sustancias se examinaron en términos de producción de ácido hialurónico (HA) y expresión de las enzimas involucradas en la síntesis del ácido hialurónico (HAS1, HAS2 y HAS3) y las enzimas involucradas en la degradación del ácido hialurónico (HYAL1 y HYAL2) en concentraciones de 0 a 50 nM durante 0 a 48 horas.

La estructura química del C16:1-cPA (que se indica como "cPA" en la figura) es la siguiente.

[Fórmula 4]



El cPA nativo (indicado como "NcPA" en la figura) se preparó como se describe a continuación (véanse los Ejemplos 1 y 3 de la Solicitud de Patente Japonesa n.º 2011-126901).

Se disolvieron fosfolípidos de soja (10 g; contenido de lecitina: 70 %) en 100 ml de una solución de acetato 1 M (pH

6,5) con cloruro de calcio 0,3 M, se agregaron 6000 unidades de fosfolipasa A2 derivada de bacterias del género *Streptomyces*, y la mezcla se hizo reaccionar a 40 °C durante 18 horas con agitación. El pH de la solución de reacción se ajustó a 2,5 para inactivar la enzima, se agregaron y mezclaron bien por agitación 100 ml de cloroformo y 50 ml de metanol, y se extrajeron los componentes lipídicos. Se tomó una muestra de la capa de cloroformo y se expuso a presión reducida en un evaporador giratorio hasta que se secó y solidificó. Se agregó acetona (100 ml) al componente sólido para precipitar los fosfolípidos y se quitaron los ácidos grasos libres. El precipitado (5 g) se disolvió en 40 ml de cloroformo, se agregaron 10 ml de solución tampón de acetato 1 M (pH 5,5) y 1500 unidades de fosfolipasa D derivada de bacterias del género *Actinomadura*, y la mezcla se hizo reaccionar a 40 °C durante 18 horas con agitación. Se agregaron a la solución de reacción 20 ml de cloruro de sodio 3 M y 20 ml de solución de ácido etilendiaminotetraacético (EDTA) 0,1 M y la solución resultante se agitó a 40 °C durante 1 hora. A continuación, se agregaron 20 ml de metanol, la solución se agitó bien y la solución resultante se centrifugó a 3000 rpm durante 5 minutos para recoger la capa de cloroformo. La solución se expuso a presión reducida en un evaporador giratorio hasta que se secó y solidificó, y se obtuvieron 3,8 g de sal sódica de ácido fosfatídico cíclico. El rendimiento fue de 54,3 %, dado que se obtuvieron 3,8 g de sal sódica de ácido fosfatídico cíclico a partir de fosfolípidos de soja con un contenido de lecitina de 70 % (es decir, 7 g de lecitina en 10 g de fosfolípidos de soja). La pureza de una sal sódica de ácido fosfatídico cíclico se analizó con una placa de gel de sílice. La muestra se extendió sobre la placa con cloroformo, metanol, ácido acético y bisulfito de sodio al 5 % (en una proporción de 100:40:12:5 por volumen, respectivamente), y la placa se empapó en una mezcla de acetato de cobre al 5 %, ácido fosfórico al 8 % y ácido sulfúrico al 2 % durante un breve período de tiempo. La placa se dejó secar al aire y se calentó a 180 °C durante unos 10 minutos. Luego, las manchas formadas se inspeccionaron con un escáner (fabricado por ATTO Corporation). Específicamente, se usó un producto de referencia (pureza: 97 %) como muestra de control y las manchas del cromatograma de capa fina se inspeccionaron con un densímetro, seguido por una cuantificación basada en la proporción de superficie. La pureza de la sal sódica de ácido fosfatídico cíclico en el producto obtenido en el paso anterior fue de 54 %.

La sal sódica de ácido fosfatídico cíclico (500 mg) se disolvió en 5 ml de cloroformo con 10 % de metanol, se aplicó a una columna de gel de sílice, se extendió con la ayuda del solvente descrito anteriormente, se extendió nuevamente con la ayuda de cloroformo con 20 % de metanol y se fraccionó en fracciones de 10 ml cada una. Se obtuvieron fracciones que contenían sal sódica de ácido fosfatídico cíclico con el método de TLC descrito anteriormente y las mismas se expusieron a presión reducida en un evaporador giratorio hasta que se secaron y solidificaron. De esta manera, se obtuvieron 320 mg de polvo de sal sódica de ácido fosfatídico cíclico. La pureza de la sal sódica de ácido fosfatídico cíclico en la muestra fue de 95 %.

(1-3) Medición de la expresión de las enzimas involucradas en la síntesis del HA y las enzimas involucradas en la degradación del HA

Un cultivo de condrocitos se reemplazó con un medio sin suero 24 horas antes de iniciar el experimento y se agregó cPA o N-cPA en distintas concentraciones (0, 5, 10, 25 o 50 µM). Además, un cultivo de células periósticas se reemplazó con un medio sin suero 24 horas antes de iniciar el experimento y se agregó cPA en distintas concentraciones (0, 10 o 25 µM). Se aisló ARN total del cultivo de células 0, 0,5, 1, 2 y 4 horas más tarde, se sintetizó el ADN complementario y se cuantificaron los niveles de expresión de HAS1, HAS2, HAS3, HYAL1 y HYAL2 por PCR en tiempo real. El nivel de expresión se determinó en términos relativos al gen de la β actina (gen de control) y se representó en términos relativos al valor de control sin la adición de cPA o N-cPA o bien el valor antes de la adición de cPA o N-cPA, que se normalizó a 1.

Específicamente, el cociente de expresión se determinó mediante el método $\Delta\Delta Ct$, que comprende comparar la diferencia entre los valores de ciclo umbral (valor de Ct) obtenidos para el gen de interés y para el gen de control en una muestra con la correspondiente diferencia entre valores de Ct obtenida en una muestra de control, según se describe a continuación.

1) El valor de ΔCt se determina con el Ct obtenido en una muestra:

$$\Delta Ct = Ct (\text{gen de interés}) - Ct (\text{gen de control})$$

2) El valor de $\Delta\Delta Ct$ se determina de la siguiente manera:

$$\Delta\Delta Ct = \Delta Ct (\text{muestra de interés}) - \Delta Ct (\text{muestra de control})$$

3) Luego, el nivel de expresión en la muestra de interés se normaliza:

$$2^{(-\Delta\Delta Ct)}$$

4) Los cambios en los niveles de expresión del gen de interés se determinan en términos relativos al valor correspondiente a la muestra de control normalizado a 1.

(1-4) Medición de la producción de ácido hialurónico (HA)

Un cultivo de condrocitos se reemplazó con un medio sin suero 48 horas antes de iniciar el experimento y se agregó cPA y N-cPA en distintas concentraciones (0, 10 o 50 μ M). Se tomaron muestras del sobrenadante del cultivo 0, 6, 12, 24 y 48 horas más tarde. Mediante el método de ELISA sándwich, que involucra el uso de proteínas ligadoras de HA derivadas de cartílago nasal bovino (kit QnE Hyaluronic Acid ELISA Assay; Biotech Trading Partners, Inc.), se cuantificó la producción de HA.

(2) Resultados

(2-1) Resultados de los ensayos de expresión de las enzimas involucradas en la síntesis del HA y las enzimas involucradas en la degradación del HA

Las Figuras 1 a 5 muestran, cada una, resultados de los ensayos de expresión de las enzimas involucradas en la síntesis del HA y las enzimas involucradas en la degradación del HA en condrocitos. Como se observa en las Figuras 1 a 5, el C16:1-cPA (cPA) indujo continuamente la expresión de HAS2 de manera dependiente de la concentración. Aunque la expresión de HAS1 y HAS3 se indujo transitoriamente 2 horas después de la adición, el nivel de expresión se redujo 4 horas después. El NcPA produjo resultados similares. La expresión de las enzimas que degradan el HA (HYAL1, HYAL2 y HYAL3) no se vio afectada. Estos resultados demuestran que el cPA y el NcPA inducen la expresión de las enzimas involucradas en la síntesis del HA. Por otra parte, la Fig. 7 muestra los resultados de un ensayo de expresión de las enzimas involucradas en la síntesis del HA en sinoviocitos, mientras que la Fig. 8 muestra los resultados de un ensayo de expresión de las enzimas involucradas en la degradación del HA en sinoviocitos.

(2-2) Resultados de la medición de la producción de ácido hialurónico (HA)

La Fig. 6 muestra los resultados de la medición de producción de HA. Como se observa en la Fig. 6, el C16:1-cPA (cPA) aceleró la síntesis de HA en condrocitos con el paso del tiempo y liberó HA hacia el exterior de las células. Cuarenta y ocho horas después, la cantidad de HA producido en el grupo al que se le añadió cPA 50 nM fue aproximadamente 3 veces mayor a la cantidad de HA producido en el grupo que recibió el vehículo. El NcPA produjo resultados similares. Estos resultados demuestran que el C16:1-cPA (cPA) y el NcPA aceleran la producción de HA en condrocitos articulares con osteoartritis (OA).

(3) Conclusiones

Se observó que el ácido fosfatídico cíclico o ácido fosfatídico carbacíclico representado por la Fórmula (I) indujo la expresión de las enzimas involucradas en la síntesis del HA y aceleró la producción de HA en condrocitos articulares de seres humanos con OA, como en el caso de los fibroblastos dérmicos.

Ejemplo 2: evaluación de los efectos del ScPA sobre la osteoartritis en rodillas de conejo

(1) Método

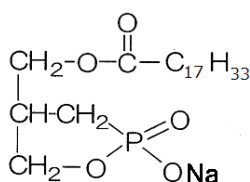
(1-1) Animales utilizados y condiciones de cría

Se usaron doce conejos machos de 11 a 12 semanas de edad (Kbs:NZW). Los conejos se criaron en jaulas separadas (un conejo por jaula) a una temperatura entre 14,4 $^{\circ}$ C y 24,9 $^{\circ}$ C con iluminación (12 horas, desde las 7:00 a. m. hasta las 7:00 p. m.) y ventilación continua. Se les permitió a los conejos comer 150 g de alimento (CR-3, CLEA Japan, Inc.) por día y tomar agua potable.

(1-2) Sustancias a administrar

Se usó sal sódica de ácido (9Z)-9-octadecenoico-(2-hidroxi-2-oxi-1,2-oxafosfolan-4-il)metil éster (C18:1-cPA; en adelante, "ScPA").

[Fórmula 5]



Se usó suero fisiológico como vehículo.

(1-3) Preparación de un modelo de osteoartritis

Se afeitó el pelo en las cercanías de la articulación de la rodilla de la extremidad posterior derecha de un conejo con alicates eléctricos con anestesia profunda y la zona afeitada se desinfectó con Isodine. Se realizó una incisión en la cubierta exterior del aspecto medial de la extremidad posterior derecha con un escalpelo. Luego, se realizó otra incisión en la unión entre el aspecto medial y la cápsula articular del ligamento patelofemoral, y se disecó el ligamento patelofemoral. A continuación, la cápsula articular se abrió por completo para dejar expuesto el menisco medial, que se extrajo por completo. Luego de la extracción del menisco, se suturaron el tejido y la epidermis en las cercanías de la cápsula articular. Al momento de la sutura, el sitio de la operación se lavó con suero fisiológico (título: 500 mg/20 ml) con antibióticos (Viccillin, Meiji Seika Pharma Co., Ltd.).

El día del tratamiento quirúrgico (día 0), se les permitió a los conejos tomar agua libremente en ayunas. El despertamiento se confirmó al observar movimiento espontáneo de las cabezas. Para evitar que los animales perdieran temperatura corporal, se les envolvió el torso con toallas para mantenerlos calientes hasta confirmar que habían despertado. Asimismo, se cambiaron adecuadamente las posiciones corporales para evitar la acumulación de sangre. A los fines del control de infecciones, se administró intramuscularmente un antibiótico (Viccillin: 3 unidades/kg) una vez por día hasta 5 días después del tratamiento (día 5).

Luego de que se prepararan los animales modelo, los mismos se dividieron en dos grupos de 6 individuos cada uno promediando la temperatura corporal (a saber, el grupo al que se le administró el vehículo, compuesto por los animales n.º 101 a 106, y el grupo al que se le administró la sustancia bajo estudio [ScPA], compuesto por los animales n.º 201 a 206).

(1-4) Administración del compuesto bajo estudio y el vehículo en la cavidad articular

El compuesto bajo estudio y el vehículo se administraron como se indica a continuación.

Vía de administración: en la cavidad articular

Sitio de administración: extremidad posterior derecha (extremidad tratada)

Cronograma de administración: los días 7, 11, 14, 18, 21, 25, 28, 32, 35 y 39

Dosis: Compuesto bajo estudio: 10 mg/conejo (volumen: 0,2 ml)

Vehículo: 0,2 ml/conejo

Forma de administración: mediante una jeringa de 1,0 ml (Terumo Corporation) y una aguja de inyección 27G (Terumo Corporation)

(1-5) Evaluación del dolor (distribución del peso entre ambas extremidades posteriores)

Frecuencia de medición:

Se realizaron siete mediciones en total, a saber, antes del tratamiento y 1, 2, 3, 4, 5 y 6 semanas después del tratamiento.

Método de medición:

Los pesos corporales apoyados sobre las extremidades posteriores derecha e izquierda se midieron independientemente con una balanza, y la distribución del peso sobre la extremidad tratada (extremidad posterior derecha) se determinó con la siguiente ecuación.

Distribución del peso (%) sobre la extremidad tratada (extremidad posterior derecha) = $\left[\frac{\text{extremidad posterior derecha (kg)}}{\text{extremidad posterior derecha (kg)} + \text{extremidad posterior izquierda (kg)}} \right] \times 100$

(1-6) Evaluación de la inflamación (inflamación articular en ambas extremidades posteriores)

Frecuencia de medición:

La medición se realizó 6 semanas después del tratamiento.

Método de medición:

Se midieron las zonas más anchas de las articulaciones de las extremidades posteriores izquierda y derecha con calibres digitales y la inflamación articular inducida por la osteoartritis se determinó de acuerdo con la siguiente ecuación.

Inflamación (%) de la extremidad tratada (extremidad posterior derecha) = $\left[\frac{\text{extremidad posterior derecha (mm)} - \text{extremidad posterior izquierda (mm)}}{\text{extremidad posterior izquierda (mm)} + \text{extremidad posterior izquierda (mm)}} \right] \times 100$

(1-7) Toma de muestras de biomaterial (día 42) y tratamiento posterior a la toma de muestras

Se disecaron las cuatro extremidades de los animales con anestesia profunda, causándoles la muerte por desangramiento. Luego, se extrajeron el cóndilo femoral y el cóndilo tibial de la articulación de la rodilla de la extremidad tratada (la extremidad posterior derecha), seguido por la fijación en una solución neutra tamponada de formalina al 10 %.

(1-8) Preparación de especímenes patológicos y evaluación histopatológica de los mismos

El fémur y la tibia que se habían empapado y fijado en una solución neutra tamponada de formalina al 10 % se sometieron a desmineralización con EDTA. Una vez que se completó la desmineralización, los sitios coloreados que se identifican a continuación se embebieron en parafina de acuerdo con una técnica convencional y el resultado se cortó en láminas con un espesor de 4 μ m cada una. Las láminas se sometieron a tinción con hematoxilina-eosina (HE) y a tinción con safranina O (proteoglicanos) y se examinaron histopatológicamente con un microscopio óptico (BX51TF; OLYMPUS). El grado de degeneración del cartílago en los especímenes patológicos se evaluó de acuerdo con los criterios que se muestran en la Tabla 1 siguiente (Kikuchi, T, Yoneda, H. et al., Osteoarthritis cartilage, 4; p. 99 y ss., 1996). Específicamente, los especímenes se evaluaron en términos de pérdida de los 8 puntos siguientes de acuerdo con una escala de cinco grados (0 a +4): capa superficial; erosión del cartílago; fibrilación y/o fisura; menor tincionabilidad de proteoglicanos (tincionabilidad con safranina O); desorganización de condrocitos; pérdida de condrocitos; exposición del hueso subcondral; y formación de cúmulos. Se definió como puntuación general la suma de la puntuación obtenida en cada uno de los puntos. Los puntos de observación para los cuales la Tabla 1 no define criterios específicos se evaluaron de acuerdo con los criterios que se muestran en la Tabla 2 (Naoki Ishiguro et al., Journal of Surgery, 29: p. 112 y ss., 2010).

[Tabla 1]

Observación/puntuación	1	2	3	4
Pérdida de capa superficial	<vista	Moderada	Focalmente grave	Extensa y grave
Erosión del cartílago	<detectable	Moderada	Focalmente grave	Extensa y grave
Fibrilación y/o fisuras	<observable (<1 muy pequeña)	Moderada (1 pequeña)	Marcada (2 peq. o 1 mediana)	Extensa (3 peq., 2 med. o 1 grande)
Pérdida de proteoglicano	Tincón más leve que el control	Pérdida moderada de safranofilia	Pérdida marcada de safranofilia	Pérdida total de safranofilia
Desorganización de condrocitos	Observable	Moderada, con	Pérdida marcada de	No reconocible
Pérdida de condrocitos	Disminución en células <observable	Disminuc. moder. en células	Dismin. marcada en células	Dismin. muy extensa en células
Exposición del hueso subcondral	Exposición del hueso <focal	Exposición moderada d/ hueso	Exposición bastante extensa d/hueso	Exposición muy extensa d/hueso
Form. de cúmulos ^{a)}	<3-4 peq., o 1-2	5-6 peq., 3-4	7 o más peq., 5-	7 o más medianos

a) Pequeño: 2 a 4 células; mediano: 5 a 8 celular; grade: 9 o más células

[Tabla 2]

Observación	Punt.	Criterios
Erosión del cartilago	0	Sin cambios
	1	Se observan lesiones limitadas a las capas superficiales a intermedias en 1/3 o menos de la superficie del sitio de evaluación en la dirección de la anchura.
	2	Se observan lesiones limitadas a las capas superficiales a intermedias en 1/3 a 2/3 de la superficie, o bien se observan lesiones que llegan a la capa profunda en 1/3 o menos de la superficie.
	3	Se observan lesiones limitadas a las capas superficiales a intermedias en 2/3 o más de la superficie, o bien se observan lesiones que llegan a la capa profunda en 1/3 a 2/3 de la superficie.
	4	Se observan lesiones limitadas a las capas superficiales a intermedias en toda la superficie, o bien se observan lesiones que llegan a la capa profunda en 2/3 o más de la superficie.
Fibrilación/fisura	0	Sin cambios
	1	Se observan lesiones limitadas a las capas superficiales a intermedias en 1/3 o menos de la superficie del sitio de evaluación en la dirección de la anchura.
	2	Se observan lesiones limitadas a las capas superficiales a intermedias en 1/3 a 2/3 de la superficie, o bien se observan lesiones que llegan a la capa profunda en 1/3 o menos de la superficie.
	3	Se observan lesiones limitadas a las capas superficiales a intermedias en 2/3 o más de la superficie, o bien se observan lesiones que llegan a la capa profunda en 1/3 a 2/3 de la superficie.
	4	Se observan lesiones limitadas a las capas superficiales a intermedias en toda la superficie, o bien se observan lesiones que llegan a la capa profunda en 2/3 o más de la superficie.
Pérdida de la capa superficial	0	Sin cambios
	1	Las lesiones representan 1/4 o menos de la superficie del sitio de evaluación.
	2	Las lesiones representan entre 1/4 y 2/4 de la superficie del sitio de evaluación.
	3	Las lesiones representan entre 2/4 y 3/4 de la superficie del sitio de evaluación.
	4	Las lesiones representan 3/4 o más de la superficie del sitio de evaluación.
Menor tincionabilidad de proteoglicanos	0	Sin cambios
	1	Las lesiones representan 1/4 o menos de la superficie del sitio de evaluación.
	2	Las lesiones representan entre 1/4 y 2/4 de la superficie del sitio de evaluación.
	3	Las lesiones representan entre 2/4 y 3/4 de la superficie del sitio de evaluación.
	4	Las lesiones representan 3/4 o más de la superficie del sitio de evaluación.
Desorganización de condrocitos	0	Sin cambios
	1	Las lesiones representan 1/4 o menos de la superficie del sitio de evaluación.
	2	Las lesiones representan entre 1/4 y 2/4 de la superficie del sitio de evaluación.
	3	Las lesiones representan entre 2/4 y 3/4 de la superficie del sitio de evaluación.
	4	Las lesiones representan 3/4 o más de la superficie del sitio de evaluación.
Pérdida de condrocitos	0	Sin cambios
	1	Las lesiones representan 1/8 o menos de la superficie del sitio de evaluación.
	2	Las lesiones representan entre 1/8 y 1/3 de la superficie del sitio de evaluación.
	3	Las lesiones representan entre 1/3 y 2/3 de la superficie del sitio de evaluación.
	4	Las lesiones representan 2/3 o más de la superficie del sitio de evaluación.
Exposición de hueso subcondral	0	Sin cambios
	1	Las lesiones representan 1/8 o menos de la superficie del sitio de evaluación.
	2	Las lesiones representan entre 1/8 y 1/3 de la superficie del sitio de evaluación.
	3	Las lesiones representan entre 1/3 y 2/3 de la superficie del sitio de evaluación.
	4	Las lesiones representan 2/3 o más de la superficie del sitio de evaluación.
Formación de cúmulos	0	Sin cambios
	1	Las lesiones representan 1/8 o menos de la superficie del sitio de evaluación.
	2	Las lesiones representan entre 1/8 y 1/3 de la superficie del sitio de evaluación.
	3	Las lesiones representan entre 1/3 y 2/3 de la superficie del sitio de evaluación.
	4	Las lesiones representan 2/3 o más de la superficie del sitio de evaluación.

5 (1-9) Procesamiento de datos y análisis estadístico

Se determinaron independiente la media de grupo (media) y el correspondiente error estándar (SE) de la distribución del peso entre ambas extremidades posteriores y de la inflamación articular de ambas extremidades posteriores. A continuación, se aplicó la prueba F al grupo al que se le administró la sustancia bajo estudio y al grupo al que se le administró el vehículo. En los casos en los que no había varianza entre las muestras, se aplicó la prueba t de Student. En los casos en los que había varianza entre las muestras, se aplicó la prueba t de Aspin-Welch. En lo que refiere a las puntuaciones generales de los puntos de evaluación de la prueba histopatológica, se determinaron la

10

media de grupo (media) y su error estándar (SE), luego de lo cual se determinó la diferencia entre las medias de ambos grupos mediante la prueba U de Mann-Whitney. Los niveles de significación estadística bilaterales se ajustaron a 5 % y 1 %.

5 (2) Resultados

(2-1) Evaluación del dolor (distribución del peso entre ambas extremidades posteriores)

La Tabla 3 y la Fig. 9 muestran los cambios en la distribución del peso entre ambas extremidades posteriores desde el día en el que se prepararon los animales modelo (día 0) y el día en el que se tomaron las muestras de biomaterial (día 42). En el grupo al que se le administró el vehículo, se observó recuperación de la invasión quirúrgica hasta el día 14. Luego, se indujo la osteoartritis, el peso apoyado sobre la extremidad tratada (la extremidad posterior derecha) disminuyó debido al dolor causado por la osteoartritis, y tal peso disminuyó hasta valores que alcanzaron 28,0 % el día en el que se tomaron las muestras de biomaterial (día 42). En el grupo al que se le administró la sustancia bajo estudio, en cambio, se observó recuperación de la invasión quirúrgica hasta el día 14 al igual que en el caso del grupo al que se le administró el vehículo y, a continuación, el peso apoyado sobre la extremidad tratada (la extremidad posterior derecha) se mantuvo en niveles mayores que en el grupo al que se le administró el vehículo hasta el día en que se tomaron las muestras de biomaterial (día 42). Se observó una diferencia significativa como resultado de la medición el día 42 ($p = 0,0053$).

[Tabla 3]

Tabla 3: evaluación del dolor (distribución del peso entre ambas extremidades posteriores)

Grupo	N.º animal	Punto	Día 0	Día 7	Día 14	Día 21	Día 28	Día 35	Día 42
Grupo al que se le administró el vehículo	101	Extrem. pos. der. (g)	630	360	550	290	450	440	340
		Extrem. pos. izq. (g)	500	390	700	750	650	650	910
		Distrib. del peso (%)	56	47	44	28	41	40	27
	102	Extrem. pos. der. (g)	550	240	160	320	100	130	80
		Extrem. pos. izq. (g)	500	500	160	320	300	800	550
		Distrib. del peso (%)	52	32	50	50	25	14	13
	103	Extrem. pos. der. (g)	470	420	370	490	520	300	470
		Extrem. pos. izq. (g)	510	700	670	740	720	580	720
		Distrib. del peso (%)	48	38	36	40	42	34	39
	104	Extrem. pos. der. (g)	390	300	200	380	480	510	290
		Extrem. pos. izq. (g)	450	640	500	600	550	750	930
		Distrib. del peso (%)	46	32	29	39	47	40	24
	105	Extrem. pos. der. (g)	540	270	600	410	290	370	370
		Extrem. pos. izq. (g)	460	610	500	610	480	350	870
		Distrib. del peso (%)	54	31	55	40	38	51	30
	106	Extrem. pos. der. (g)	380	50	450	450	590	380	490
		Extrem. pos. izq. (g)	460	340	500	680	740	760	900
		Distrib. del peso (%)	45	13	47	40	44	33	35
	Media		50.3	32.1	43.3	39.4	39.4	35.6	28.0
	SE		1.77	4.60	3.94	2.87	3.14	5.07	3.83
	(%)								
Grupo al que se le administró la sust. bajo estudio	201	Extrem. pos. der. (g)	660	660	520	380	600	350	440
		Extrem. pos. izq. (g)	610	1010	770	710	700	650	620
		Distrib. del peso (%)	52	40	40	35	46	35	42
	202	Extrem. pos. der. (g)	320	160	200	370	150	350	510
		Extrem. pos. izq. (g)	400	410	400	440	290	800	700
		Distrib. del peso (%)	44	28	33	46	34	30	42
	203	Extrem. pos. der. (g)	410	140	320	720	390	380	630
		Extrem. pos. izq. (g)	550	900	640	350	260	470	380
		Distrib. del peso (%)	43	13	33	67	60	45	62
	204	Extrem. pos. der. (g)	490	520	630	250	660	630	660
		Extrem. pos. izq. (g)	460	750	810	580	750	1030	820
		Distrib. del peso (%)	52	41	44	30	47	38	45
	205	Extrem. pos. der. (g)	270	430	380	450	600	560	520
		Extrem. pos. izq. (g)	260	880	700	760	710	670	840
		Distrib. del peso (%)	51	33	35	37	46	50	38
	206	Extrem. pos. der. (g)	350	460	610	440	780	510	610
		Extrem. pos. izq. (g)	310	750	600	580	800	870	580
		Distrib. del peso (%)	53	38	50	43	49	37	51
	Media		49.1	32.1	39.4	43.0	47.0	39.1	46.7
	SE		1.79	4.21	2.78	5.36	3.38	2.82	3.61
	P Volum		0.6486	0.9960	0.4310	0.5641	0.1295	0.5602	0.0053**
	(%)								

(2-2) Evaluación de la inflamación (inflamación articular en ambas extremidades posteriores)

La Tabla 4 y la Fig. 10 muestran los valores porcentuales de inflamación articular de ambas extremidades posteriores el día en el que se tomaron las muestras de biomaterial (día 42). Se midió el ancho de la articulación de un animal individual y se determinó la varianza entre los grupos. Como resultado, se observó que la inhibición de la inflamación articular fue más significativa en el grupo al que se le administró la sustancia bajo estudio que en el grupo al que se le administró el vehículo ($p = 0,0164$).

[Tabla 4]

Tabla 4: evaluación de la inflamación (inflamación de ambas extremidades posteriores)

Grupo	N.º animal	Punto	4月19日
			Día 42
Grupo al que se le administró el vehículo	101	Extrem. pos. der. (mm)	24.45
		Extrem. pos. izq. (mm)	23.98
		Inflamación (%)	1.96
	102	Extrem. pos. der. (mm)	25.86
		Extrem. pos. izq. (mm)	20.31
		Inflamación (%)	27.33
	103	Extrem. pos. der. (mm)	23.08
		Extrem. pos. izq. (mm)	21.20
		Inflamación (%)	8.87
	104	Extrem. pos. der. (mm)	24.37
		Extrem. pos. izq. (mm)	22.31
		Inflamación (%)	9.23
	105	Extrem. pos. der. (mm)	24.96
		Extrem. pos. izq. (mm)	23.00
		Inflamación (%)	8.52
	106	Extrem. pos. der. (mm)	25.44
		Extrem. pos. izq. (mm)	22.06
Inflamación (%)		15.32	
Media		11.9	
SE		3.54	
			(%)
Grupo al que se le administró la sust. bajo estudio	201	Extrem. pos. der. (mm)	24.17
		Extrem. pos. izq. (mm)	24.60
		Inflamación (%)	-1.75
	202	Extrem. pos. der. (mm)	23.75
		Extrem. pos. izq. (mm)	23.38
		Inflamación (%)	1.58
	203	Extrem. pos. der. (mm)	22.30
		Extrem. pos. izq. (mm)	21.50
		Inflamación (%)	3.72
	204	Extrem. pos. der. (mm)	21.63
		Extrem. pos. izq. (mm)	22.88
		Inflamación (%)	-5.46
	205	Extrem. pos. der. (mm)	24.74
		Extrem. pos. izq. (mm)	23.21
		Inflamación (%)	6.59
	206	Extrem. pos. der. (mm)	21.36
		Extrem. pos. izq. (mm)	21.79
		Inflamación (%)	-1.97
	Media		0.5
SE		1.78	
P Volum		0.0164*	
			(%)

(2-3) Evaluación histopatológica

Las Tablas 5 y 6 y la Fig. 11 muestran cada una un resumen de los resultados de las pruebas histopatológicas, y la Fig. 12 muestra imágenes histopatológicas de ejemplos representativos.

Tanto en el grupo al que se le administró el vehículo como en el grupo al que se le administró la sustancia bajo estudio

estudio, básicamente no se observaron daños causados por la preparación de los modelos de osteoartritis en los cóndilos laterales del fémur ni en los de la tibia.

5 En lo que respecta al cóndilo medial del fémur, se observó pérdida de la capa superficial del cartílago articular, menor tincionabilidad de los proteoglicanos, desorganización de condrocitos, pérdida de condrocitos y formación de
 10 cúmulos en las 6 muestras del grupo al que se le administró el vehículo, y se observó erosión del cartílago en 5 de las 6 muestras en cuestión. El grado de formación de cúmulos fue particularmente elevado en todas las muestras (media = $2,50 \pm 0,43$). Las puntuaciones histopatológicas de los puntos de observación fueron 9, 21, 17, 11, 8 y 20 (media = $14,33 \pm 2,33$), y se observaron cambios leves a graves en el cartílago articular de todas las muestras. En lo
 15 que respecta al cóndilo medial del fémur, se observó formación de cúmulos en las 6 muestras del grupo al que se le administró la sustancia bajo estudio, y se observó pérdida de la capa superficial del cartílago, erosión del cartílago y desorganización de condrocitos en 5 de las 6 muestras en cuestión. Las puntuaciones histopatológicas fueron 5, 6, 10, 3, 20 y 6 (media = $8,33 \pm 2,51$), y tales cambios observados en 4 de las 6 muestras fueron menores a los observados en el grupo al que se le administró el vehículo en las mismas regiones. Esto significa que las puntuaciones histopatológicas del grupo al que se le administró la sustancia bajo estudio fueron menores que las correspondientes al grupo al que se le administró el vehículo ($p = 0,0649$).

20 En lo que respecta al cóndilo medial de la tibia, se observó pérdida de la capa superficial del cartílago articular, fibrilación y/o fisura del cartílago, y desorganización de condrocitos en las 6 muestras del grupo al que se le administró el vehículo, y se observó menor tincionabilidad de los proteoglicanos en 5 de las 6 muestras en cuestión. Las puntuaciones histopatológicas fueron 8, 27, 14, 5, 3 y 18 (media = $12,50 \pm 3,69$), y se observaron cambios leves a graves en el cartílago articular de 4 de las 6 muestras. En el grupo al que se le administró la sustancia bajo estudio, se observó fibrilación y/o fisura del cartílago en las 6 muestras, y se observó pérdida de la capa superficial de cartílago y menor tincionabilidad de los proteoglicanos en 5 de las 6 muestras. Las puntuaciones histopatológicas
 25 fueron 4, 16, 6, 1, 27 y 9 (media = $10,50 \pm 3,91$).

[Tabla 5]

Tabla 5
Observación histopatológica (cóndilo medial del fémur)

Grupo N.º animal	Grupo vehículo I										Grupo sustancia bajo estudio I									
	101	102	103	104	105	106	Media	SE	!		201	202	203	204	205	206	Media	SE	!	P Volum
Pérdida de capa superficial	1	4	2	1	1	2	1.83	0.48			1	1	1	0	3	1	1.17	0.40		
Erosión del cartilago	1	3	1	1	0	3	1.83	0.54			1	1	1	0	3	1	1.17	0.40		
Fibrilación y/o fisura	0	0	2	0	0	3	0.83	0.54			0	1	0	0	3	0	0.67	0.49		
Menor tinción de proteoglicanos	1	4	2	2	1	2	2.00	0.45			0	1	2	0	3	1	1.17	0.48		
Desorganización de condrocitos	2	4	3	2	1	3	2.50	0.43			1	0	1	1	1	1	0.83	0.17		
Pérdida de condrocitos	1	2	1	1	1	1	1.17	0.17			0	0	1	1	3	0	0.83	0.48		
Exposición del hueso subcondral	0	0	0	0	0	2	0.33	0.33			0	0	0	0	2	0	0.33	0.33		
Formación de cúmulos	3	4	4	4	4	4	3.83	0.17			2	2	4	1	2	2	2.17	0.40		
Puntuación histopatológica	9	21	17	11	8	20	14.33	2.33			5	6	10	3	20	6	8.33	2.51		0.0649

Escala de observación: 0: ninguno; 1: escasa; 2: leve; 3: moderado; 4: grave

Observación histopatológica (cóndilo lateral del fémur)

Grupo N.º animal	Grupo vehículo										Grupo sustancia bajo estudio									
	101	102	103	104	105	106	201	202	203	204	205	206								
Pérdida de capa superficial	0	1	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1	0							
Erosión del cartilago	0	1	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1	0							
Fibrilación y/o fisura	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0							
Menor tinción de proteoglicanos	0	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0							
Desorganización de condrocitos	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0							
Pérdida de condrocitos	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0							
Exposición del hueso subcondral	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0							
Formación de cúmulos	0	3	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0							
Puntuación histopatológica	0	8	0	0	0	0	0	0	0	2	0	2	0							

Escala de observación: 0: ninguno; 1: escasa; 2: leve; 3: moderado; 4: grave

[Tabla 6]

Tabla 6
Observación histopatológica (cóndilo medial de la tibia)

Grupo	Grupo vehículo										Grupo sustancia bajo estudio										P	Volum
	N.º animal	101	102	103	104	105	106	Media	SE		201	202	203	204	205	206	Media	SE				
Pérdida de capa superficial		1	3	2	1	1	3	1.83	0.40		1	3	1	0	4	3	2.00	0.63				
Erosión del cartilago		1	3	2	0	0	3	1.50	0.56		0	2	1	0	3	1	1.17	0.48				
Fibrilación y/o fisura		2	3	1	1	1	3	1.83	0.40		2	1	1	1	3	1	1.50	0.34				
Menor tinción de proteoglicanos		1	4	2	1	0	2	1.67	0.56		1	4	1	0	4	1	1.83	0.70				
Desorganización de condrocitos		2	4	2	1	1	2	2.00	0.45		0	2	1	0	4	1	1.33	0.61				
Pérdida de condrocitos		1	3	1	0	0	1	1.00	0.45		0	0	0	0	3	1	0.67	0.49				
Exposición del hueso subcondral		0	3	0	0	0	0	0.50	0.60		0	0	0	0	3	0	0.50	0.50				
Formación de cúmulos		0	4	4	1	0	4	2.17	0.83		0	4	1	0	3	1	1.50	0.67				
Puntuación histopatológica		8	27	14	5	3	18	12.50	3.69		4	16	6	1	27	9	10.50	3.91				0.6391

Escala de observación: 0: ninguno; 1: escasa; 2: leve; 3: moderado; 4: grave

Observación histopatológica (cóndilo lateral de la tibia)

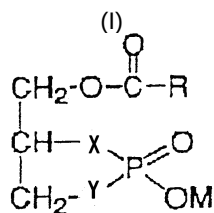
Grupo		Grupo vehículo										Grupo sustancia bajo estudio									
	N.º animal	101	102	103	104	105	106	201	202	203	204	205	206								
	Pérdida de capa superficial	0	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0								
	Erosión del cartilago	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0								
	Fibrilación y/o fisura	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0								
	Menor tinción de proteoglicanos	0	4	0	0	0	0	1	1	0	0	1	0								
	Desorganización de condrocitos	0	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0								
	Pérdida de condrocitos	0	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0								
	Exposición del hueso subcondral	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0								
	Formación de cúmulos	0	3	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0								
	Puntuación histopatológica	0	15	0	0	0	0	1	1	0	0	1	0								

Escala de observación: 0: ninguno; 1: escasa; 2: leve; 3: moderado; 4: grave

REIVINDICACIONES

1. Un compuesto representado por la Fórmula (I) como principio activo para usar en el tratamiento de la artrosis,

5



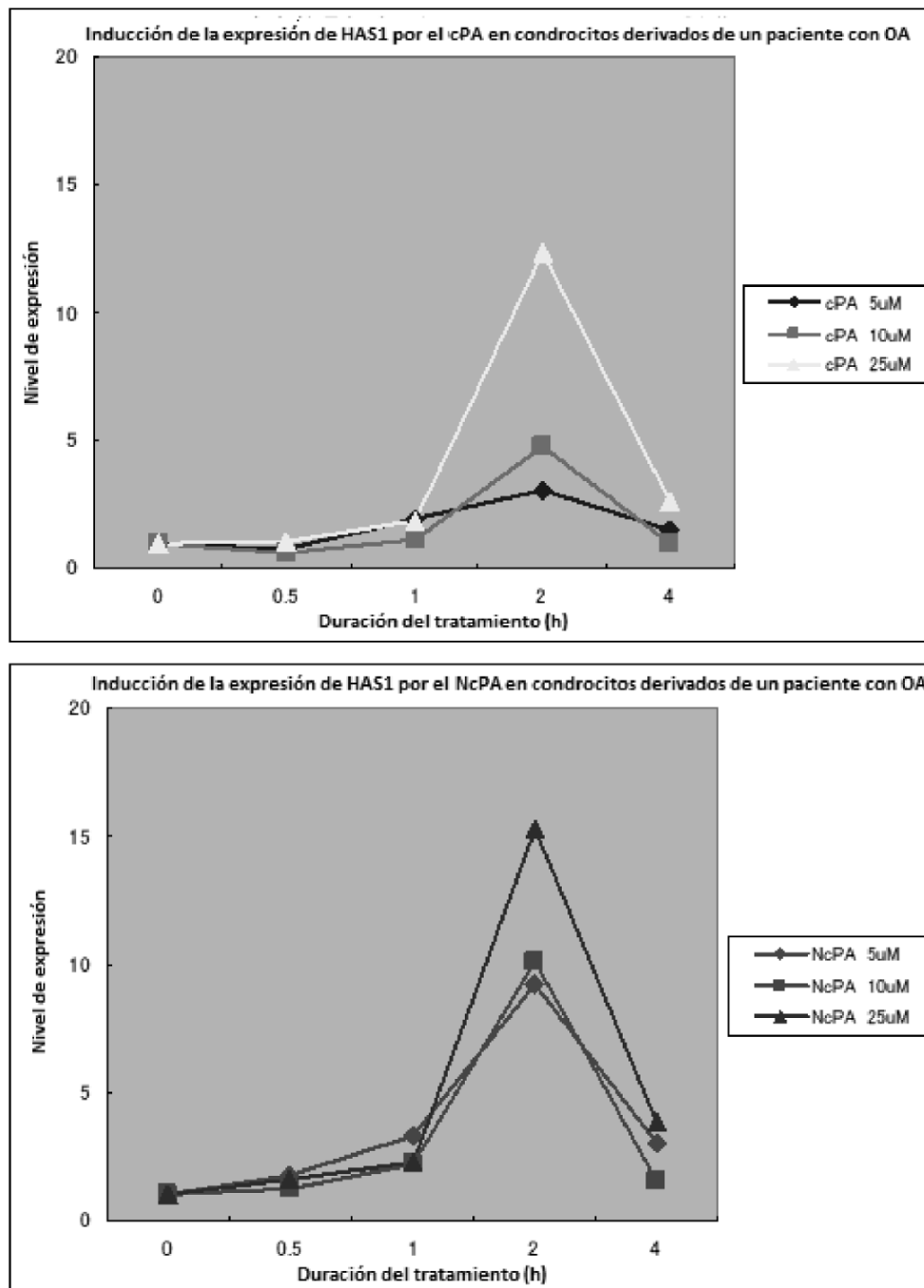
10 donde R representa un grupo alquilo lineal o ramificado con 1 a 30 átomos de carbono, un grupo alquenilo lineal o ramificado con 2 a 30 átomos de carbono, o un grupo alquinilo lineal o ramificado con 2 a 30 átomos de carbono, que pueden contener un anillo cicloalcanico o aromático; X e Y representan, cada una independientemente de la otra, un átomo de oxígeno o un grupo metileno, con la salvedad de que X e Y no representen simultáneamente un grupo metileno; y M representa un átomo de hidrógeno o un átomo de un metal alcalino.

15 2. Un compuesto para usar de acuerdo con la reivindicación 1, en donde, en la Fórmula (I), X e Y representan un átomo de oxígeno.

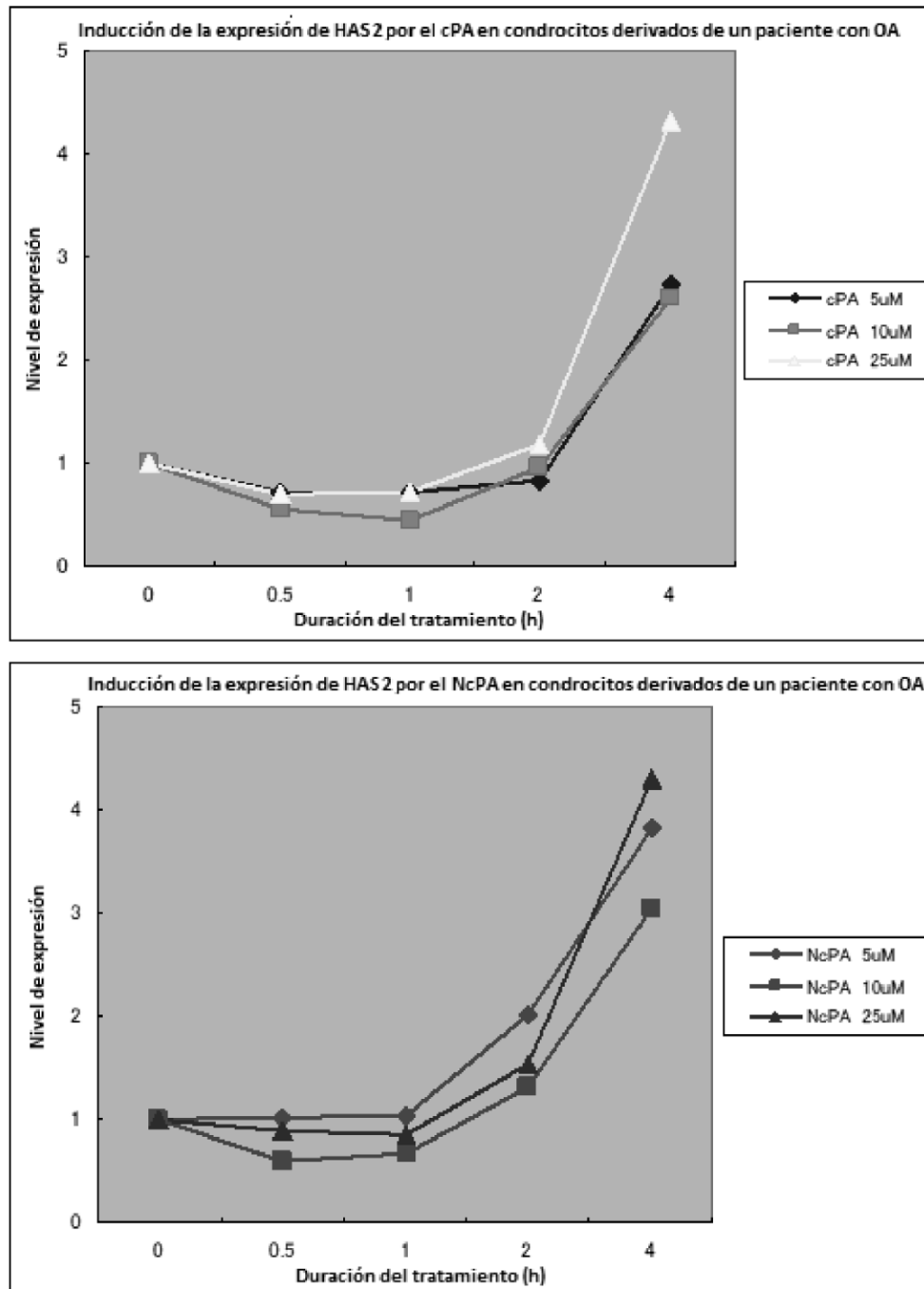
3. Un compuesto para usar de acuerdo con las reivindicaciones 1 o 2, en donde, en la Fórmula (I), una de las letras X o Y representa un átomo de oxígeno y la otra representa un grupo metileno.

20 4. Un compuesto para usar de acuerdo con las reivindicaciones 1 a 3, en donde el compuesto representado por la Fórmula (I) es el ácido fosfatídico carbacíclico de ácido fosfatídico cíclico 1-oleilo o ácido fosfatídico cíclico 1-palmitoleilo.

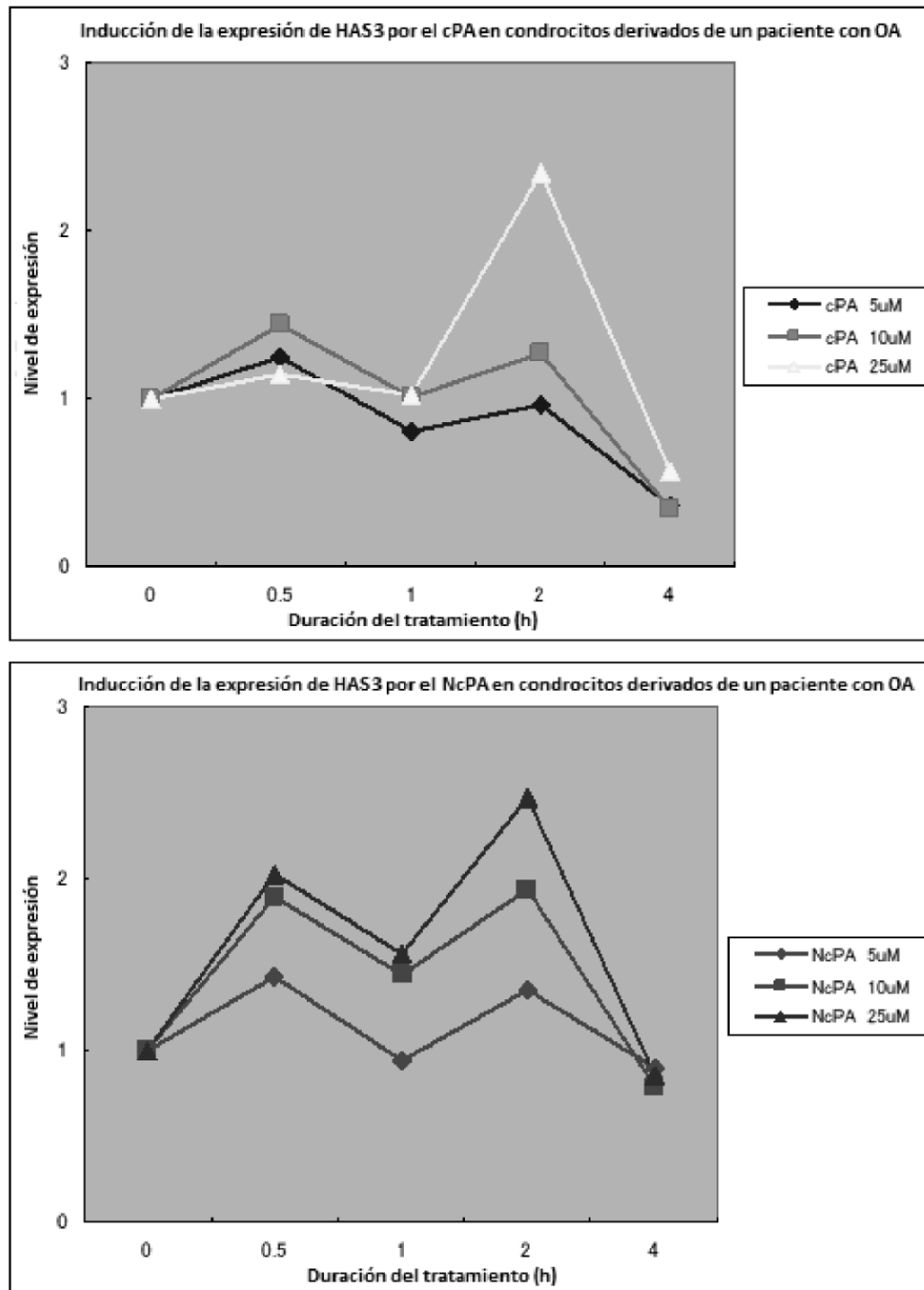
[Fig. 1]



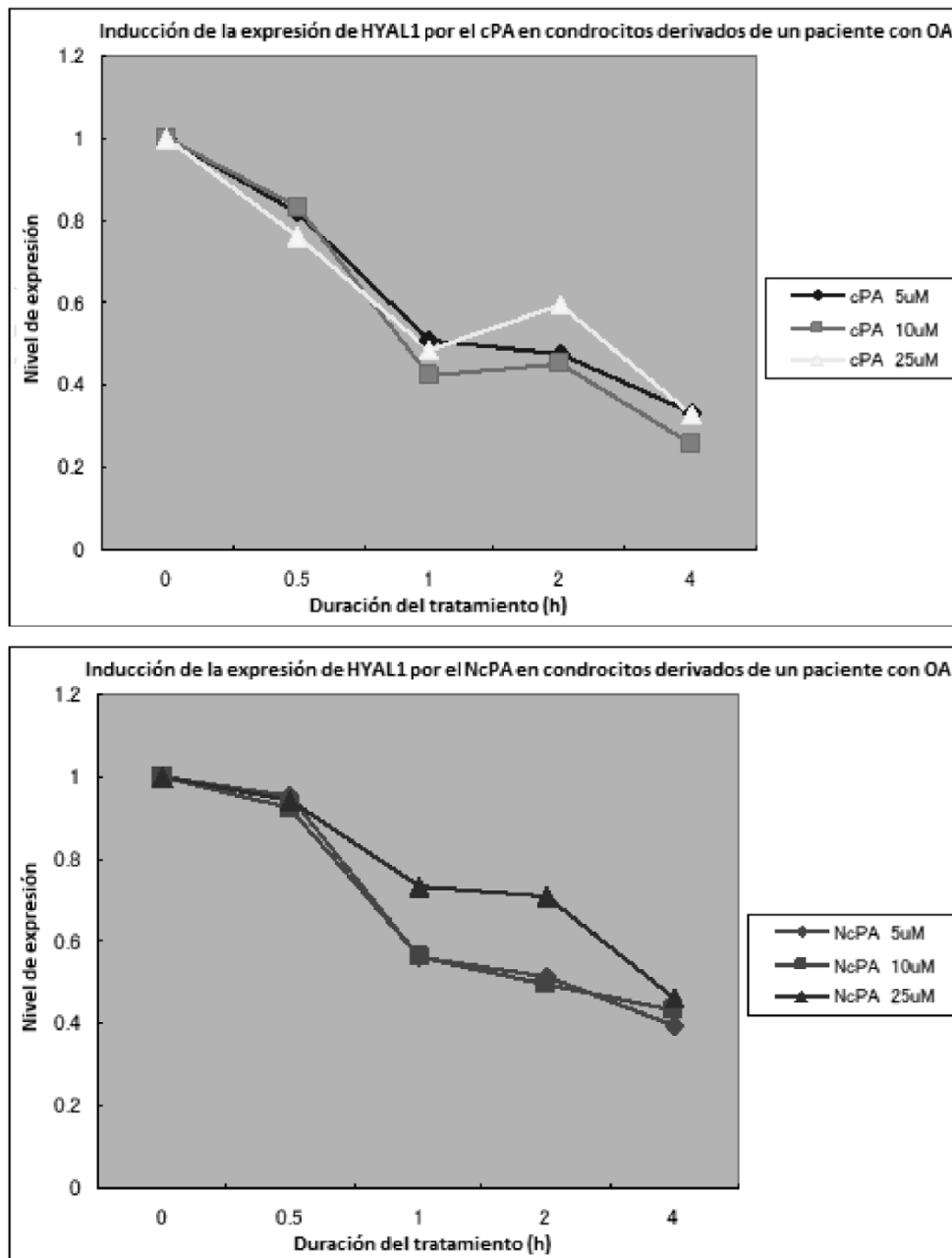
[Fig. 2]



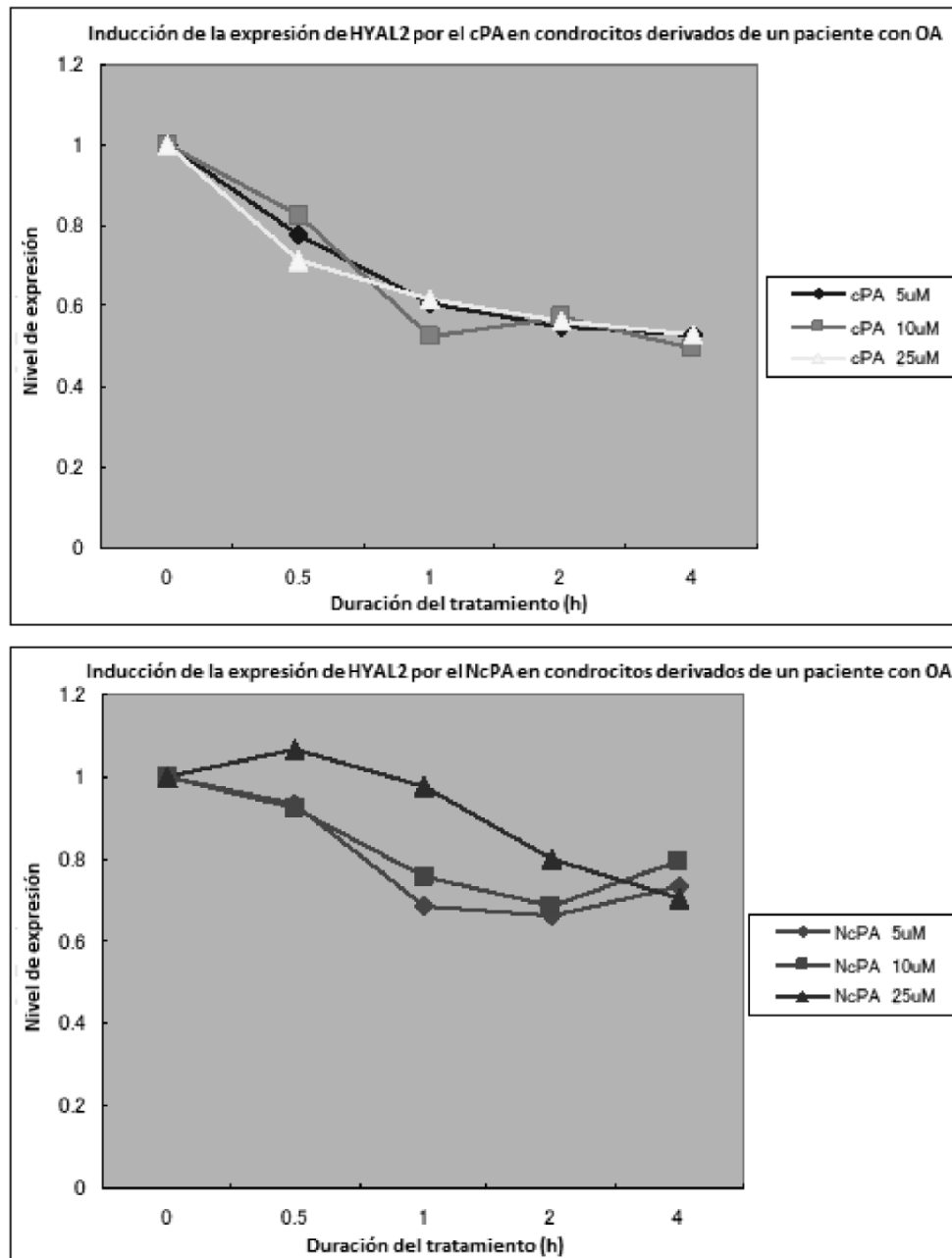
[Fig. 3]



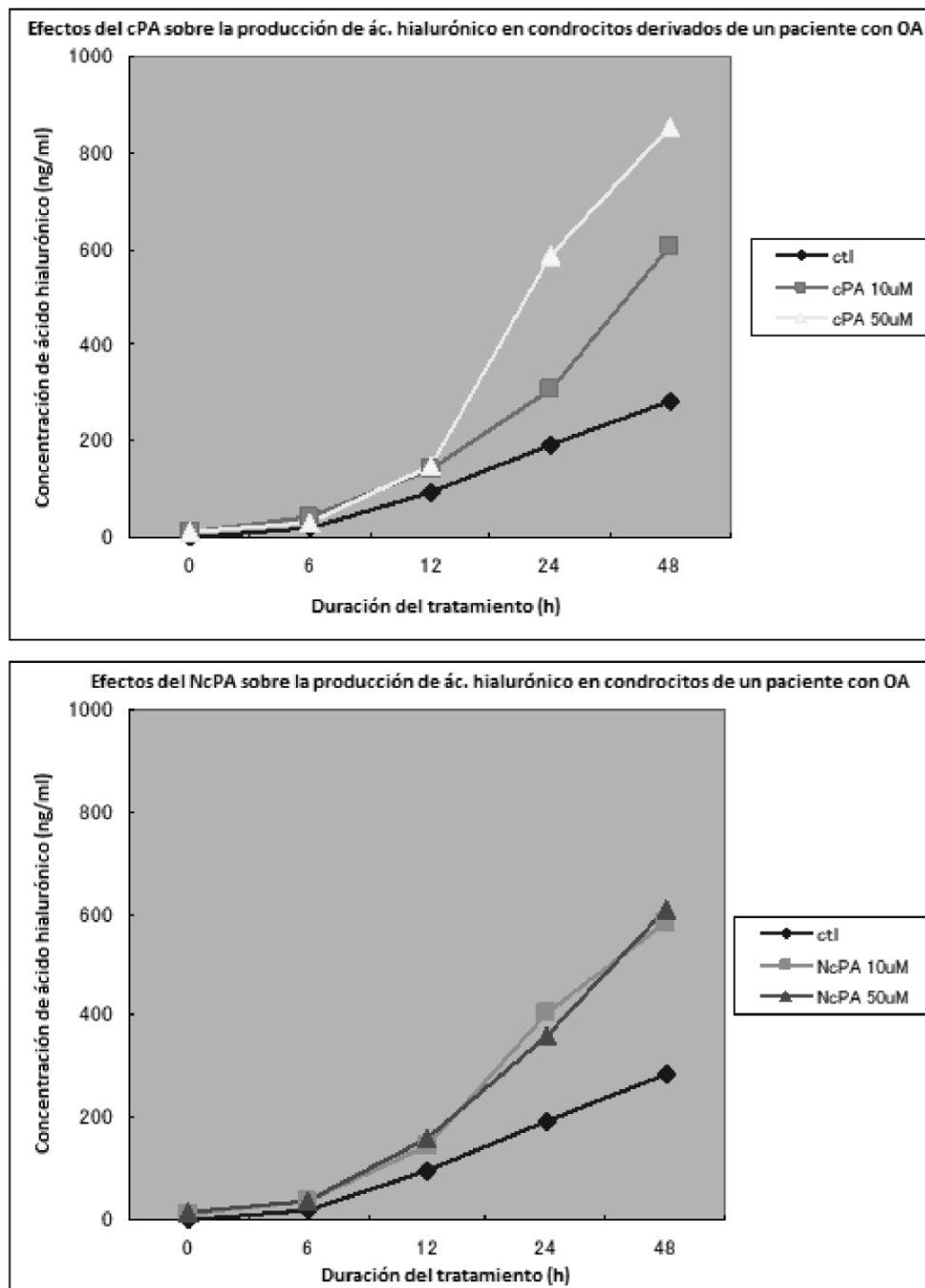
[Fig. 4]



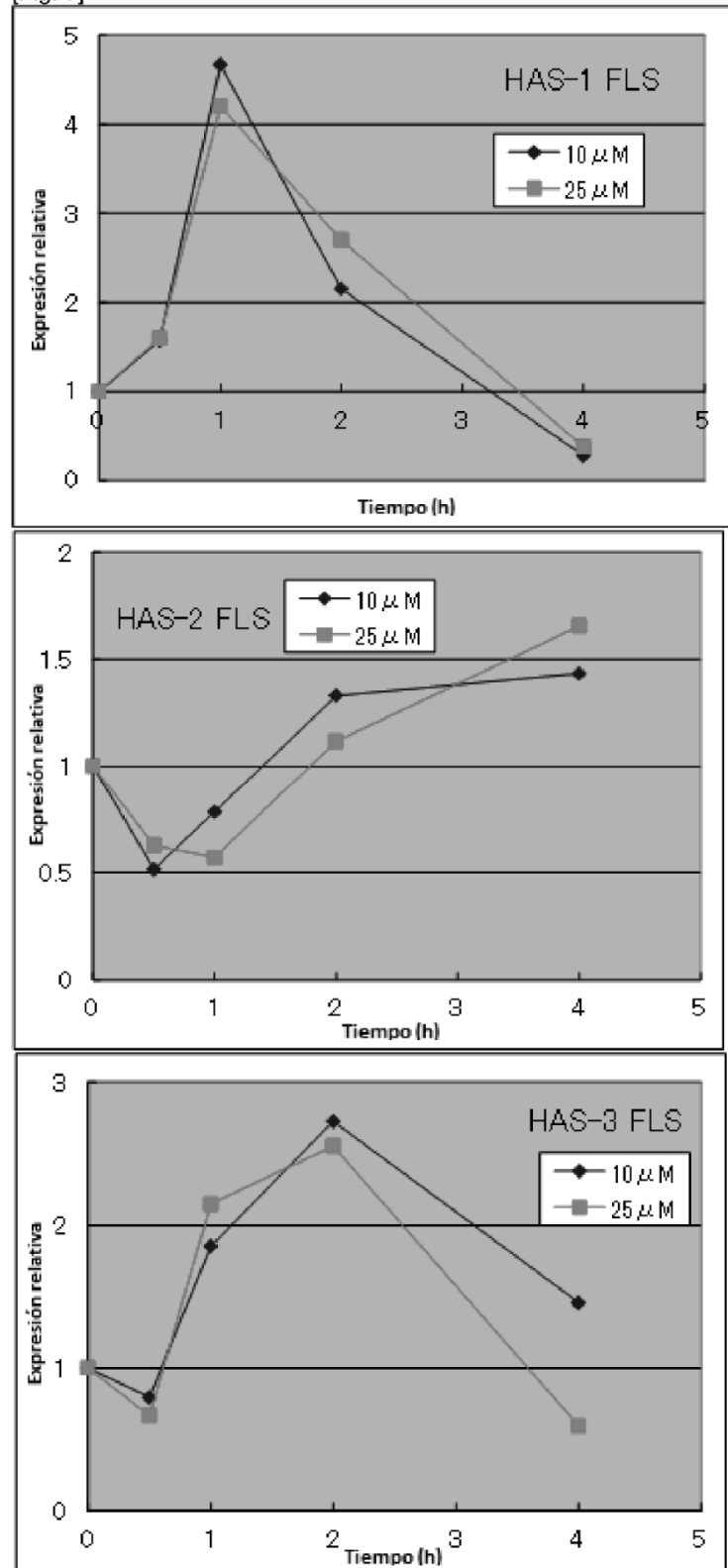
[Fig. 5]



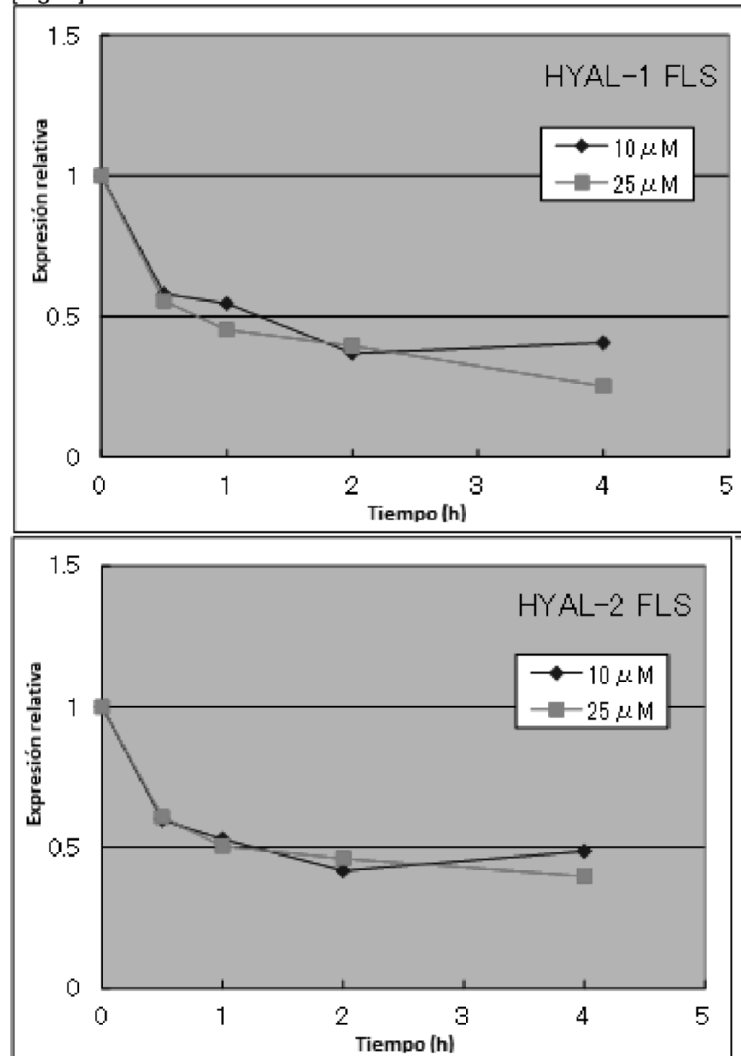
[Fig. 6]



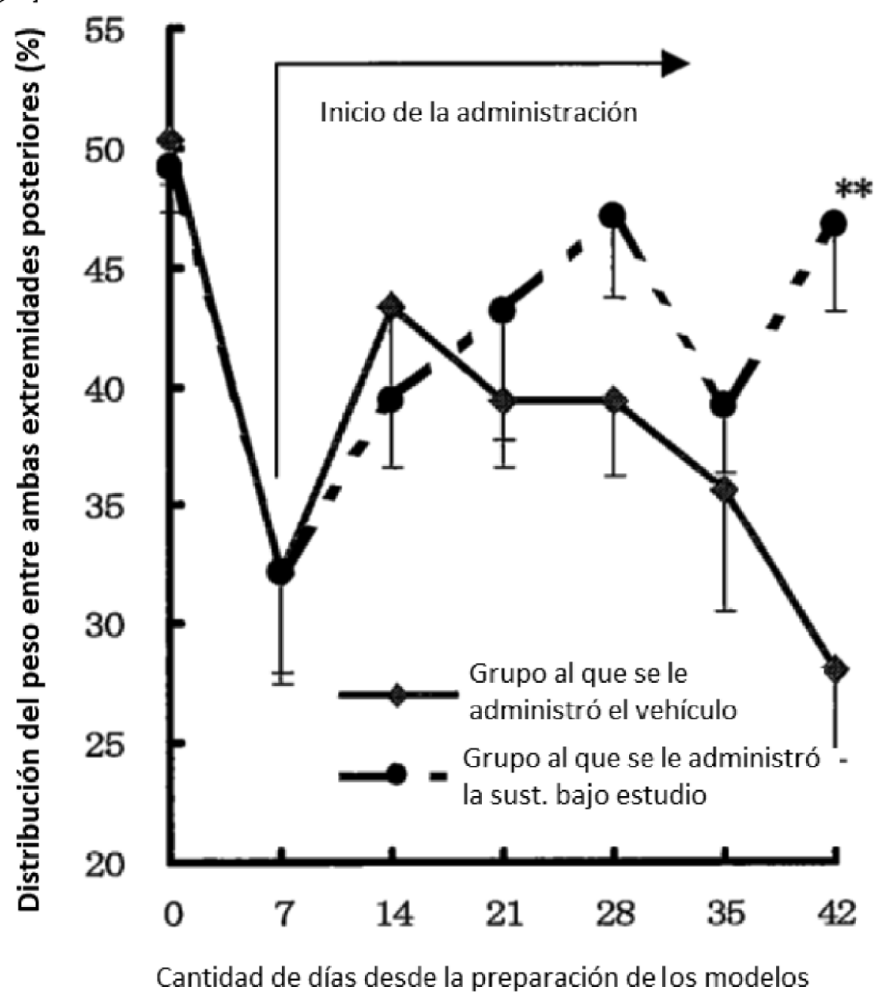
[Fig. 7]



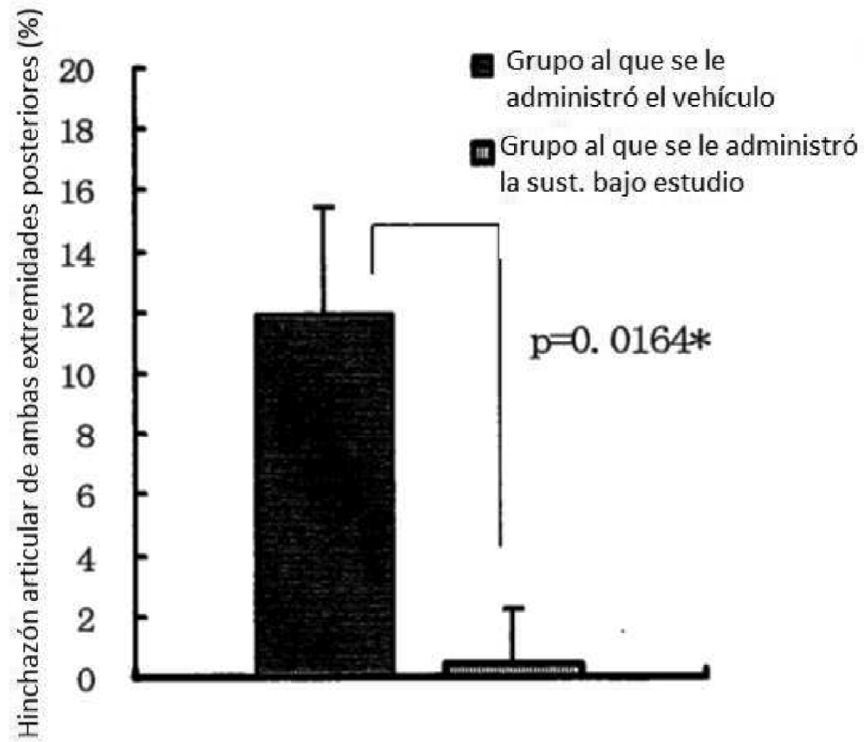
[Fig. 8]



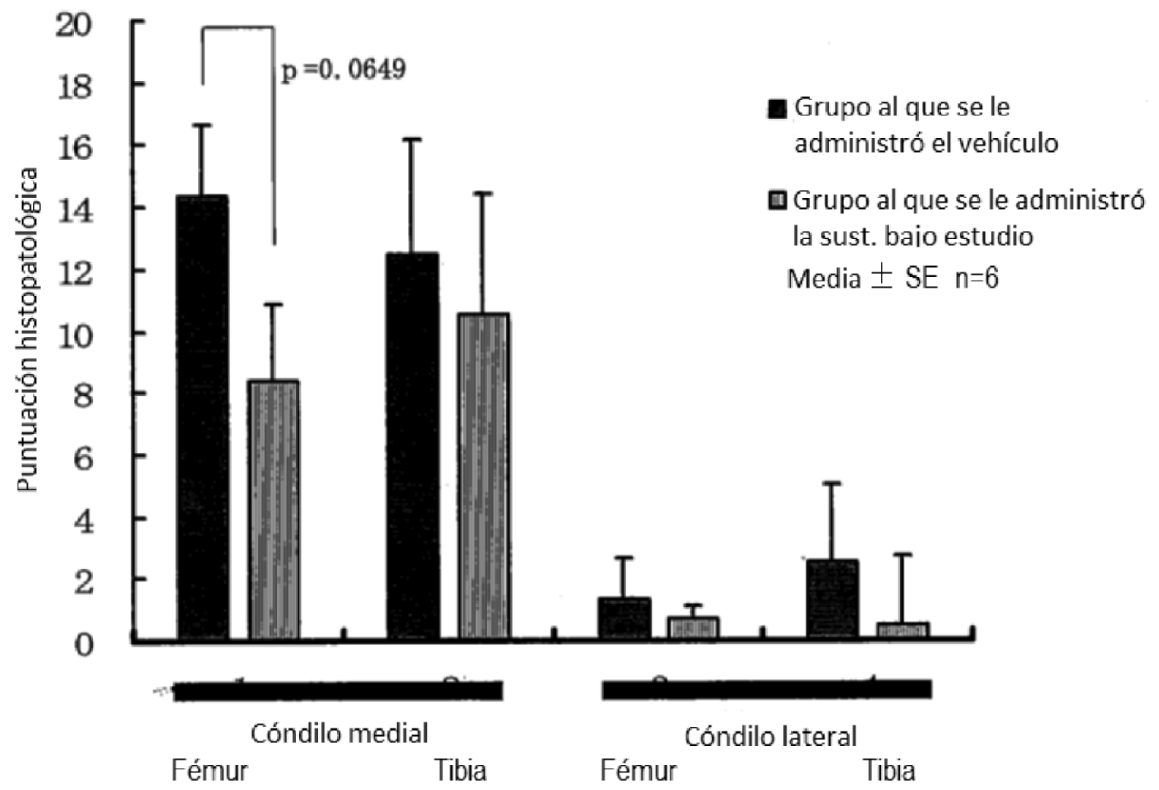
[Fig. 9]



[Fig. 10]

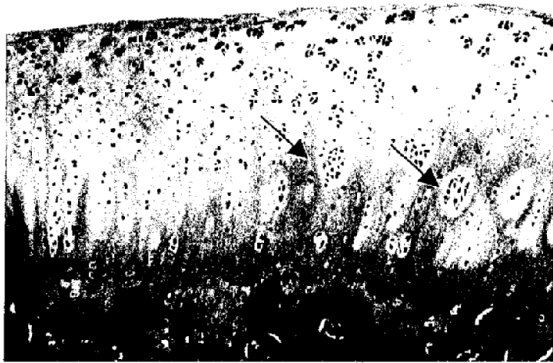


[Fig. 11]

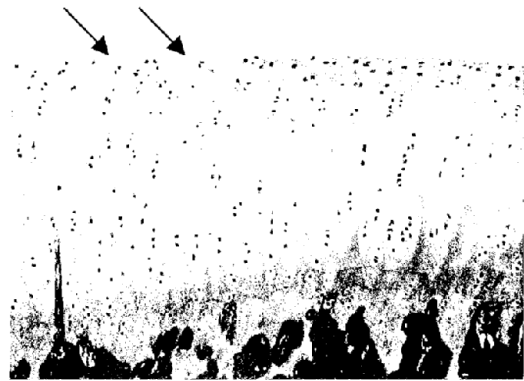


[Fig. 12]

A



B



C



D

