

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 637 163**

51 Int. Cl.:

A61L 27/20 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **21.02.2008 PCT/JP2008/052999**

87 Fecha y número de publicación internacional: **28.08.2008 WO08102855**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **21.02.2008 E 08720791 (6)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **17.05.2017 EP 2127687**

54 Título: **Composición de tratamiento de condropatías**

30 Prioridad:

21.02.2007 JP 2007041520
24.10.2007 JP 2007277005

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
11.10.2017

73 Titular/es:

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

72 Inventor/es:

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

74 Agente/Representante:

CARPINTERO LÓPEZ, Mario

ES 2 637 163 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín Europeo de Patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre Concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Composición de tratamiento de condropatías

Campo técnico

La presente invención se refiere a una composición para su uso en el tratamiento de una condropatía.

5 Antecedentes de la invención

Por ejemplo, el cartílago articular es un cartílago hialino que está formado por un pequeño número de células, matriz extracelular colagenosa, abundantes proteoglicanos y agua. En el caso del hueso, dado que hay presentes redes vasculares y neurales y que el hueso tiene la capacidad de autorrepararse, incluso si se ha producido una fractura, la fractura es frecuentemente reparada por completo. Sin embargo, el cartílago articular carece de las redes vascular y neural. Consecuentemente, no tiene prácticamente ningún potencial de autorreparación, y en el caso de la formación de grandes defectos en el cartílago en particular, el defecto del cartílago no es reparado adecuadamente. Incluso en aquellas porciones que son reparadas, se forma un cartílago fibroso que tiene unas propiedades mecánicas diferentes a las del cartílago hialino. Consecuentemente, cuando se forma un defecto en el cartílago, aparece dolor y pérdida de la función que frecuentemente progresa hasta una artrosis. Además, un defecto en el cartílago puede llegar a tener un amplio alcance como resultado los síntomas que progresan desde las etapas iniciales de la artrosis, que comienzan con el desgaste de la superficie del cartílago articular debido al envejecimiento o a un excesivo uso de la articulación

De esta forma, dado que el cartílago articular carece de una adecuada capacidad de autorreparación, son necesarios procedimientos quirúrgicos para el tratamiento de lesiones del cartílago, algunos ejemplos de los cuales incluyen mosaicoplastia, microfractura, perforación, abrasión y desbridamiento. De entre estos, la microfractura, la perforación y la abrasión se denominan técnicas de estimulación medular, y favorecen el aporte sanguíneo desde la médula ósea para inducir a las células precursoras del cartílago derivadas de la médula ósea por adelantado en su diferenciación en cartílago. Sin embargo, estas técnicas tienen limitaciones con respecto a los defectos de cartílago que cubren un área importante, y el cartílago regenerado mediante estos procedimientos está en forma de un cartílago fibroso que tiene unas propiedades mecánicas diferentes a las del cartílago hialino.

Peterson et al. y Grande et al. probaron una técnica de implante de condrocitos autólogos (ACI) en cartílago articular de conejo de espesor parcial en 1984. La ACI es una técnica que implica la recolección y el cultivo de tejido a partir del propio cartílago normal de un paciente, de implantación de las células cultivadas en un área afectada mientras están suspendidas en un medio, y el recubrimiento del defecto del cartílago con el periostio para impedir la pérdida de las células. La ACI se aplicó por primera vez en clínica en 1994 y ha estado actualmente en práctica durante más de 15 años. Se han notificado numerosos resultados con éxito. Sin embargo, estudios clínicos recientes han notificado que la ACI no produce unos resultados significativamente superiores cuando se compara con otras técnicas para la reparación de defectos en el cartílago articular.

Existen dos razones principales por las que se obtienen estos resultados desfavorables con la ACI. La primera es la dificultad técnica relacionada con la fijación de las células y el soporte para el defecto del cartílago, y el recubrimiento del defecto con un colgajo perióstico. La técnica de ACI requiere una amplia exposición artrotómica de la articulación para que el colgajo perióstico cubra la suspensión celular. Además, se han notificado numerosas complicaciones relacionadas con el colgajo perióstico, incluyendo hipertrofia perióstica, formación de defectos y adhesiones intraarticulares. La otra razón implica limitaciones con el uso de condrocitos. Los condrocitos pierden rápidamente su fenotipo diferencial en cultivos monocapa, transformándose en fibroblastos. Otro problema es que aunque la ACI requiere la recolección de cartílago desde un sitio no portador de peso de la articulación, los sitios del donante siguen siendo problemáticos debido a que se recogen los condrocitos a partir de los mismos.

Por otro lado, también están progresando los intentos de uso de polímeros naturales tales como colágeno, quitosan, agarosa y ácido algínico en la terapia regenerativa del cartílago articular. En particular, el ácido algínico es un polisacárido extraído a partir de algas pardas tales como Ecklonia, Eisenia y Laminaria que tiene la propiedad de reticular después de la adición de calcio o de otros iones metálicos divalentes, y se han llevado a cabo intentos para aplicar ácido algínico en sitios lesionados mediante la utilización de esta propiedad para la incorporación de células tales como condrocitos, factores de crecimiento y similares, en un gel del mismo (véanse, por ejemplo, las Referencias 1, 2, 3, 4 y 5).

Por ejemplo, la Referencia 1 desvela un gel de alginato que comprende una mezcla de un alginato soluble y un alginato insoluble/gel, mientras que las Referencias 2, 3 y 4 desvelan el uso de microesferas de alginato. En la Referencia 2, puede usarse el ácido algínico como portador que no imparte ningún efecto perjudicial en un sitio lesionado, aunque se analiza que el propio ácido algínico no tiene ningún efecto terapéutico. Además, la Referencia 4 desvela que no se observaron condrocitos incorporados en microesferas de alginato fusionarse con el tejido del hospedador después del trasplante a un defecto de cartílago de conejo. Además, aunque para la aplicación de las microesferas de alginato es necesario presionarlas en un defecto, dado que es necesario producir microesferas que encajen en el tamaño del defecto, su uso en el entorno clínico real es técnicamente difícil. La Referencia 5 desvela un injerto en el que se suspenden condrocitos en alginato de sodio y se inyectan en un defecto de cartílago de

conejo, seguido de la curación de la superficie con una solución de CaCl_2 , en el que a pesar de que se forma tejido cartilaginoso normal, se forma un cartílago fibroso en el caso de la aplicación únicamente de ácido algínico en el receptor sin que contenga células.

5 Además, están progresando investigaciones sobre el uso de esponjas de colágeno y similares como soportes celulares como un ejemplo de un intento del uso de células madre mesenquimatosas para la terapia regenerativa de cartílago. Aunque se han considerado procedimientos que implican el trasplante de células madre mesenquimatosas después de una diferenciación *in vitro* en condrocitos, y procedimientos que implican el trasplante de células madre mesenquimatosas sin diferenciar, todavía existe un debate continuo sobre qué procedimiento de utilización es el óptimo (Referencia 6).

10 Dado que los defectos en el cartílago en la artrosis (OA) se producen con un gran alcance y en regiones sometidas a cargas, su reparación mediante un trasplante o una terapia regenerativa se considera difícil. Aquellos defectos del cartílago susceptibles de una regeneración del cartílago mediante un trasplante de células, como se ha descrito anteriormente, están limitados a defectos de cartílago parciales provocados principalmente por actividades deportivas o traumatismos. El tratamiento de la artrosis se centra principalmente en la eliminación del dolor y de la inflamación del área afectada, y habitualmente se trata en el extranjero mediante la administración de fármacos antiinflamatorios no esteroideos. Sin embargo, dado que la función renal puede estar deprimida en los pacientes ancianos, la administración oral continua de fármacos antiinflamatorios no esteroideos puede ser difícil desde el punto de vista de la seguridad. Los productos que incorporan ácido hialurónico, que es un componente del líquido sinovial del cartílago, mejoran la función de lubricación de las articulaciones al ser administrados en una articulación, y dado que estos productos también tienen una acción analgésica, son ampliamente usados como agentes para mejorar la función articular en la artrosis. Sin embargo, dado que finalmente no hay ninguna otra elección que la sustitución de la articulación por una articulación artificial en los casos graves de artrosis, en los que el daño articular ha progresado, existe un deseo de desarrollar un nuevo fármaco terapéutico.

[REFERENCIAS]

- 25 1. Publicación Internacional WO 2006/044342
 2. Cay M. Mierisch et al., "Transforming Growth Factor β in Calcium Alginate Beads for the Treatment of Articular Cartilage Defects in the Rabbit", *The Journal of Arthroscopic and Related Surgery*, Vol. 18, nº 8 (octubre), 2002: páginas 892-900
 30 3. David R. Diduch et al., "Marrow Stromal Cells Embedded in Alginate for Repair of Osteochondral Defects", *The Journal of Arthroscopic and Related Surgery*, Vol. 16, nº 6 (Septiembre), 2000: páginas 571-577
 4. David R. Diduch et al., "Chondrocyte Transplantation in Articular Cartilage Defects with Use of Calcium Alginate: The Fate of the Cells", *J Bone Joint Surg. Am.* 85: 2003, páginas 1757-1767
 5. E. Fragonas et al., "Articular Cartilage Repair in Rabbits by Using Suspensions of Allogenic Chondrocytes in Alginate", *Biomaterials*, Vol. 21, 2000: páginas 795-801
 35 6. *Life Science Report* nº 4, 2005 (Editor: Intellectual Property Department, Tokyo Medical and Dental University, Publicador: Maruzen Co., Ltd.), páginas 235-243, editor de cooperación: Ichiro Sekiya

Divulgación de la invención

Problemas que van a ser resueltos por la invención

40 Cuando se consideran las aplicaciones clínicas y reales para la terapia regenerativa de los defectos del cartílago de esta manera, no ha habido ninguna terapia regenerativa capaz de soportar el uso práctico en términos de dichos problemas de citotoxicidad, bioafinidad, facilidad de aplicación y efectos terapéuticos. A saber, ha habido una necesidad de desarrollar una composición para la regeneración del cartílago y el tratamiento de las condropatías, y de un procedimiento de tratamiento utilizando la misma, que tenga una practicidad superior mediante la superación de los problemas en el ámbito de la terapia regenerativa del cartílago, al ser capaz de favorecer de forma eficaz la regeneración del cartílago sin necesitar un procedimiento quirúrgico excesivo como en la ACI, que tenga un procedimiento simple y sin colocar una carga excesiva en el cuerpo en términos de recogida de condrocitos, periostio y similares, siendo susceptible de ser usada en una amplia variedad de diversas formas de lesiones del cartílago independientemente de las condiciones de aplicación, reduciendo los efectos perjudiciales de los agentes de reticulación y similares aplicados en las lesiones de cartílago, y que tenga una bioafinidad superior. En particular, además tiene que ser una composición capaz de regenerar el cartílago hialino utilizando únicamente un polímero sin la incorporación de células.

55 Aunque la artrosis es una enfermedad degenerativa en la que el cartílago articular se desgasta debido al envejecimiento y al excesivo uso de la articulación, además de las causas mecánicas de desgaste, también se dice que las respuestas inflamatorias locales, tales como la producción de citocinas inflamatorias por parte de las células sinoviales y de los condrocitos, la inducción de sustancias algésicas y de proteasas por parte de citocinas inflamatorias, están implicadas en la destrucción articular. A saber, acompañando al desgaste del cartílago articular (daño mecánico), se induce una respuesta inflamatoria en el interior del tejido articular, el daño autodestructivo del cartílago progresa debido a esta respuesta inflamatoria y el daño mecánico progresa adicionalmente debido a la disminución en la función articular, dando así como resultado un ciclo vicioso que exacerba adicionalmente la

enfermedad. Por lo tanto, son necesarios fármacos terapéuticos para la artrosis para proporcionar unos efectos integrales que incluyan efectos que protejan al cartílago del desgaste, efectos que inhiban los cambios degenerativos en el cartílago causados por el desgaste y la inflamación, efectos que reparen la lesión del cartílago y efectos que supriman la inflamación y el dolor. Si se pudiera obtener un fármaco capaz de inhibir la inflamación y de suprimir el dolor en las articulaciones, podría ser aplicado en el tratamiento de la periartritis escapulohumeral y en la supresión del dolor articular en la artritis reumatoide crónica. El ácido hialurónico es inherentemente un componente principal del líquido sinovial, y su reposición mejora la función articular. Actualmente no existe ningún fármaco conocido que tenga unos efectos terapéuticos integrales sobre el tejido del cartílago diferente al ácido hialurónico. Las preparaciones de ácido hialurónico se producen mediante la extracción a partir de tejido animal o de una fermentación, y se aspira a nuevos materiales que puedan ser producidos más fácilmente y ofrezcan un mayor nivel de seguridad. Además, aunque las preparaciones de ácido hialurónico requieren inicialmente cinco administraciones semanales consecutivas, seguidas de administraciones repetidas a continuación, se aspira a una nueva composición que tenga una duración mayor y unos efectos terapéuticos mejores con objeto de reducir el número de inyecciones en la articulación de la rodilla.

15 **Medio para resolver los problemas**

Los inventores de la presente invención llevan a cabo amplios estudios para resolver los problemas mencionados anteriormente. Como resultado se averiguó que mediante la aplicación a una lesión del cartílago de una composición según la reivindicación 1, puede favorecerse la regeneración del cartílago mediante una técnica simple sin la necesidad de un procedimiento quirúrgico excesivo.

20 Cuando se aplicó esta composición a un defecto en el cartílago articular y se aplicó una solución CaCl_2 a la superficie de la misma, la composición no se movió del sitio de aplicación. Sorprendentemente, se averiguó que la composición puede ser aplicada incluso en los sitios sometidos a una carga en unas condiciones de movimiento sumamente agresivas en forma de un cartílago articular. Como resultado de hacer que la viscosidad de la composición de la presente invención sea de aproximadamente 2.000 mPa · s o más, la composición puede ser aplicada incluso si la superficie lesionada está orientada hacia abajo.

Incluso en el caso de no incluir células madre mesenquimatosas de la médula ósea ni células estromales, se averiguó que la composición de la presente invención permitía la obtención de una regeneración satisfactoria del cartílago hialino por parte de los condrocitos hialinos, dando lugar así a la consecución de la presente invención.

30 Además, se averiguó que los cambios degenerativos en el cartílago estaban inhibidos y se averiguó que podrían obtenerse unos efectos protectores sobre el cartílago mediante la aplicación en una lesión de cartílago en un modelo de artrosis de una composición que contiene una sal metálica monovalente del ácido alginico para la cual el nivel de endotoxinas de la misma se ha reducido hasta un punto que no induce sustancialmente fiebre ni inflamación. Además, también se averiguó que esta composición tiene efectos que suprimen el dolor en un modelo de dolor artrítico experimental, dando lugar así a la consecución de la presente invención.

35 Este es el primer caso en el que se ha demostrado que una sustancia distinta al ácido hialurónico, que es uno de los componentes principales del líquido sinovial, tiene efectos combinados sobre el tejido del cartílago de esta forma. Fue sorprendente averiguar que el ácido alginico, que es un polímero procedente de algas y que no está presente inherentemente en los animales, tenga efectos tales como estos.

40 A saber, la presente invención proporciona composiciones para su uso en el tratamiento de una condropatía que son adecuadas para ser inyectadas en una articulación según se define en las reivindicaciones 1-12 y 14-15. Además, la presente invención proporciona una sal metálica monovalente del ácido alginico con un bajo contenido en endotoxinas para su uso en el tratamiento de una condropatía y para su uso en la inyección en una articulación según la reivindicación 13.

Efectos de la invención

45 Dado que la composición para la regeneración del cartílago de la presente invención puede ser inyectada en una lesión de un cartílago sin requerir un procedimiento quirúrgico excesivo, el procedimiento es simple. La regeneración del cartílago, y particularmente la regeneración del cartílago hialino puede favorecerse eficazmente sin colocar una carga excesiva en el cuerpo términos de recolección de condrocitos, periostio y similares.

50 La composición para la regeneración del cartílago de la presente invención tiene una curabilidad en gel como resultado de haberse puesto en contacto con iones de Ca en el área afectada. La composición puede ser retenida en el área afectada a través de la región de la superficie de la misma como resultado del aprovechamiento de esta propiedad. Por lo tanto, la composición puede usarse para diversas formas de lesiones de cartílago, y es susceptible de acomodar varias condiciones de aplicación.

55 La composición para el tratamiento de una condropatía de la presente invención es capaz de demostrar efectos terapéuticos en un amplio abanico de lesiones del cartílago mediante su inyección en una articulación en estado líquido. La composición muestra al menos un efecto seleccionado entre el grupo que consiste en la reparación del cartílago en la lesión del cartílago como se observa, por ejemplo, en el envejecimiento, un traumatismo, la artrosis,

lesiones discales, lesiones de menisco u osteocondritis disecante, la inhibición de los cambios degenerativos del cartílago y la protección del cartílago.

Además, la composición para el tratamiento de una condropatía de la presente invención tiene el efecto de inhibir la inflamación articular y de suprimir el dolor asociado con la inflamación. La composición muestra una acción analgésica al inhibir las respuestas inflamatorias articulares, por ejemplo, en la artrosis, en la periartritis escapulohumeral y en la artritis reumatoide.

La composición para el tratamiento de una condropatía de la presente invención es capaz de inhibir la progresión de una condropatía y de aliviar o curar los síntomas mostrando unos efectos reparadores, protectores e inhibidores de la degeneración en lesiones mecánicas del cartílago, inhibiendo también las respuestas inflamatorias y dolorosas en el tejido articular. En particular, la composición es útil para el tratamiento de la artrosis, el tratamiento de la periartritis escapulohumeral y el alivio del dolor articular asociado con la artritis reumatoide.

Breve descripción de los dibujos

La FIG. 1 es una gráfica que muestra las tasas de supervivencia de las células frente a la concentración de varias soluciones de CaCl₂ (Ejemplo 4).

La FIG. 2 es una gráfica que muestra los efectos comparativos de microesferas de alginato purificadas de calidad alimentaria sobre las tasas de supervivencia de las células en las microesferas (Ejemplo 5).

La FIG. 3 es una gráfica que muestra los resultados de los análisis mediante una RT-PCR durante el cultivo *in vitro* del Ejemplo 6.

La FIG. 4 muestra fotografías de los resultados de la tinción durante el cultivo *in vitro* del Ejemplo 6. (A) Alginato de sodio purificado - 21 días de cultivo; (B) alginato de sodio purificado - 28 días de cultivo; (C) alginato de sodio de calidad alimentaria - 21 días de cultivo; (D) alginato de sodio de calidad alimentaria - 28 días de cultivo. La tinción se llevó a cabo con, desplazándonos de izquierda a derecha, una tinción de H-E, una tinción de Safranina-O, anticuerpos anti-colágeno anti-tipo I, anti-tipo II y anti-tipo X.

La FIG. 5 muestra fotografías que representan las imágenes obtenidas durante un procedimiento en un modelo de reparación de cartílago de conejo del Ejemplo 7.

La FIG. 6 es un diagrama que muestra los criterios de puntuación de las observaciones globales en un modelo de reparación de cartílago de conejo del Ejemplo 7.

La FIG. 7 es un diagrama que muestra los criterios de puntuación de la tinción en un modelo de reparación de cartílago de conejo del Ejemplo 7.

La FIG. 8 muestra fotografías de la tinción tisular de un grupo de control A) (vacío) en un modelo de reparación de cartílago de conejo del Ejemplo 7. La FIG. 8A muestra los resultados después de 4 semanas, mientras que la FIG. 8B muestra los resultados después de 12 semanas. Se muestran los resultados para, desplazándonos de izquierda a derecha, una tinción de H-E, una tinción de Safranina-O y una inmunotinción de colágeno de tipo I y de colágeno de tipo II.

La FIG. 9 muestra fotografías de la tinción tisular de un alginato de calidad alimentaria + el grupo de células C) en un modelo de reparación de cartílago de conejo del Ejemplo 7. La FIG. 9A muestra los resultados después de 4 semanas, mientras que la FIG. 9B muestra los resultados después de 12 semanas. Los procedimientos de tinción son los mismos que los de la FIG. 8.

La FIG. 10 muestra fotografías de la tinción tisular de un alginato purificado (sin células) grupo D) en un modelo de reparación de cartílago de conejo del Ejemplo 7. La FIG. 10A muestra los resultados después de 4 semanas, mientras que la FIG. 10B muestra los resultados después de 12 semanas. Los procedimientos de tinción son los mismos que los de la FIG. 8.

La FIG. 11 muestra fotografías de la tinción tisular de un alginato purificado + el grupo de células E) en un modelo de reparación de cartílago de conejo del Ejemplo 7. La FIG. 11A muestra los resultados después de 4 semanas, mientras que la FIG. 11B muestra los resultados después de 12 semanas. Los procedimientos de tinción son los mismos que los de la FIG. 8.

La FIG. 12 muestra los resultados de las puntuaciones de las observaciones globales y la tinción en un modelo de reparación de cartílago de conejo del Ejemplo 7.

La FIG. 13 es una gráfica que muestra los resultados de la medición de la resistencia mecánica de los grupos con alginato purificado D) y E) en un modelo de reparación de cartílago de conejo del Ejemplo 7.

La FIG. 14 muestra las fotografías obtenidas durante un experimento con un modelo de cadáver del Ejemplo 8.

La FIG. 15 es una gráfica que muestra la relación entre las concentraciones (%) y los tiempos de adhesión (s) de varias soluciones de alginato de sodio.

La FIG. 16 es una gráfica que muestra la relación entre la viscosidad (mPa · s) y el tiempo de adhesión (s) de una solución de alginato de sodio.

La FIG. 17 muestra fotografías del aspecto de las articulaciones de la rodilla en un modelo de artrosis de conejo del Ejemplo 12.

La FIG. 18 muestra fotografías de la tinción tisular del tejido de la articulación de la rodilla en un modelo de artrosis de conejo del Ejemplo 12.

La FIG. 19 muestra fotografías del aspecto de las articulaciones de la rodilla en un modelo de artrosis de conejo del Ejemplo 13 después de la tinción con tinta India. En las fotografías, las áreas rodeadas con un círculo indican los límites entre las lesiones del cartílago teñidas con tinta India y el cartílago normal. A) Grupo de control; B) grupo con una dosis de hialuronato de sodio al 1 %; C) grupo con una dosis de alginato de sodio al 2 % (peso

molecular: 400.000); D) grupo con una dosis de alginato de sodio al 2 % (peso molecular: 1.000.000); E) grupo con una dosis de alginato de sodio al 2 % (peso molecular: 1.700.000). Adicionalmente, las fotografías muestran los ejemplos de múltiples muestras.

La FIG. 20 muestra los resultados de la puntuación de los hallazgos macroscópicos de las articulaciones de la rodilla teñidas con tinta India en un modelo de artrosis de conejo del Ejemplo 13. NS, HA, AL40, AL100 y AL170 respectivamente se corresponden con A) hasta E) (igual que en la FIG. 19). El grado 1 indica una superficie no lesionada no teñida con tinta India (no hay captación de tinta India, lo que indica una superficie intacta). El grado 2 indica una tinción focal con tinta India y una leve lesión en la superficie (captación focal mínima de tinta India, una leve irregularidad superficial). El grado 3 indica una gran tinción bien definida con tinta India y una obvia fibrilación (grandes y evidentes parches oscuros focales de tinta India, fibrilación abierta). El grado 4a indica una erosión del cartílago menor de 2 mm (erosión del cartílago < 2 mm). El grado 4b indica una erosión del cartílago de entre 2 y 5 mm (erosión del cartílago 2-5 mm). El grado 4c indica una erosión del cartílago mayor de 5 mm (erosión del cartílago > 5 mm).

La FIG. 21 muestra fotografías de la tinción del tejido de la articulación de la rodilla con Safranina-O en un modelo de artrosis de conejo del Ejemplo 13. A) hasta E) son las mismas que en la FIG. 19. Adicionalmente, las fotografías muestran los ejemplos de múltiples muestras.

La FIG. 22 muestra los resultados de la puntuación de las evaluaciones histopatológicas generales en un modelo de artrosis de conejo del Ejemplo 13. NS, HA, AL40, AL100 y AL170 se corresponden respectivamente con A) hasta E) (igual que en la FIG. 19).

La FIG. 23 muestra los cambios con el tiempo en las puntuaciones de la forma de caminar en un modelo de dolor por artritis experimental de rata del Ejemplo 15. A) Grupo de control (NS); B) grupo con una dosis de hialuronato de sodio al 1 % (HA al 1 %); C) grupo con una dosis de alginato de sodio al 2 % (peso molecular: 1.000.000) (AL100 al 2 %); D) grupo con una dosis de alginato de sodio al 1 % (peso molecular: 1.700.000) (AL170 al 1 %); E) grupo con una dosis de alginato de sodio al 2 % (peso molecular: 1.700.000) (AL170 al 2 %). *: p < 0,05 frente a NS.

[TEXTO LIBRE DE LA LISTA DE SECUENCIAS]

SEQ ID NO. 1: ADN sintético
 SEQ ID NO. 2: ADN sintético
 SEQ ID NO. 3: ADN sintético
 SEQ ID NO. 4: ADN sintético
 SEQ ID NO. 5: ADN sintético
 SEQ ID NO. 6: ADN sintético
 SEQ ID NO. 7: ADN sintético
 SEQ ID NO. 8: ADN sintético
 SEQ ID NO. 9: ADN sintético
 SEQ ID NO. 10: ADN sintético

Mejor modo de llevar a cabo la invención

Aunque lo siguiente proporciona una explicación detallada de la presente invención, las siguientes realizaciones pretenden ser ejemplares para explicar la presente invención, y la presente invención puede realizarse de diversas formas sin desviarse del propósito de la misma.

1. Introducción

El "cartílago" se encuentra en las articulaciones; la pared torácica; los discos intervertebrales; el menisco; las estructuras tubulares, tales como la garganta, el tracto respiratorio y las orejas, y similares, y se clasifica en tres tipos que consisten en cartílago hialino, cartílago elástico y cartílago fibroso. Por ejemplo, el cartílago articular está clasificado como cartílago hialino, está formado por condrocitos, matriz extracelular colagenosa, proteoglicano y agua, y está exento de intervención vascular. El cartílago hialino es rico en colágeno de tipo II, y es teñido por los anticuerpos de colágeno de tipo II. También se caracteriza porque es teñido de rojo por la tinción de safranina-O usada para la tinción del proteoglicano. Una "lesión del cartílago" se refiere a un estado en el que el cartílago ha sido dañado debido al envejecimiento, un traumatismo u otros factores, y que incluye un estado en el que la función del cartílago ha disminuido, tal como la disminución en la característica viscoelasticidad del cartílago (que permite que el cartílago se comprima lentamente cuando está sometido a una carga, y después vuelva lentamente a su estado original cuando se retira la carga), provocando así un deterioro en la capacidad del cartílago para soportar una carga mientras conserva su movilidad. La lesión del cartílago se observa en enfermedades tales como la artrosis y la artritis reumatoide. La presente invención se refiere a una composición curable para la regeneración del cartílago que puede ser aplicada en dicha lesión del cartílago. Un "defecto del cartílago" se refiere a una lesión del cartílago en la que está ausente una porción del cartílago, y que indica un vacío en el tejido del cartílago, y el tejido que lo rodea que forma el vacío. La composición de la presente invención se usa preferentemente para el tratamiento de un "defecto de cartílago".

Más específicamente, la presente invención es una composición para la regeneración del cartílago que se aplica en una lesión del cartílago, contiene una sal metálica monovalente del ácido algínico para la cual el nivel de

endotoxinas de la misma se ha reducido hasta un punto en el que no induce sustancialmente fiebre ni inflamación, y tiene una viscosidad de entre 400 y 20.000 mPa • s.

Consecuentemente, dado que la composición de la presente invención es eficaz para favorecer eficazmente la regeneración del cartílago en un área afectada, muestra una adherencia satisfactoria a la lesión del cartílago y puede ser aplicada con una jeringa y similares, se aplica fácilmente a una lesión del cartílago.

En la presente invención, "regeneración del cartílago" o "regeneración del tejido del cartílago" se refiere a la restauración de la función de una lesión del cartílago para la cual se ha deteriorado o perdido la función del cartílago. En la presente invención, la restauración de la función no requiere necesariamente que la función sea restaurada completamente, sino más bien que la función sea restaurada hasta un mayor grado que el estado de la lesión del cartílago antes de la aplicación de la presente composición. En el caso de asignar un valor de un 100 % al estado del cartílago normal antes de la lesión, y de asignar un valor del 0 % al estado de la lesión del cartílago antes de la aplicación de la presente composición, la función del cartílago se restaura preferentemente hasta un 30 % o más de la misma, más preferentemente hasta un 50 % o más de la misma, incluso más preferentemente hasta un 80 % o más de la misma, y particularmente preferentemente hasta un estado prácticamente equivalente al de antes de la lesión. La proporción de cartílago distinto al cartílago hialino, tal como el cartílago fibroso, en el cartílago regenerado, es preferentemente baja. Además, el "tratamiento de una lesión del cartílago" o el "tratamiento de un defecto del cartílago" se refiere al alivio o a la curación de los síntomas del mismo mediante la regeneración del cartílago en lesiones del cartílago o en defectos del cartílago observados en el envejecimiento, por un traumatismo, por una artrosis, por una lesión discal o una lesión de menisco, por una osteocondrosis disecante y similares.

Además, la "aplicación en una lesión del cartílago" se refiere al uso de una composición para la regeneración del cartílago y similares poniéndola en contacto con una lesión del cartílago, y preferentemente al uso de la composición de la presente invención mediante su inyección en un defecto del cartílago para rellenar ese defecto del cartílago. Alternativamente, la composición de la presente invención puede usarse mediante la formación adicional de uno o más orificios comparativamente pequeños en una lesión del cartílago, y preferentemente un defecto del cartílago, e inyectar la composición de la presente invención en los orificios para rellenar los orificios. La aplicación en la lesión del cartílago se lleva a cabo preferentemente de forma que se rellene lo suficiente el volumen vacío de un área afectada. El área afectada es sometida preferentemente a un pretratamiento necesario y se irrigará según sea necesario antes de la aplicación de la presente composición. La irrigación del área afectada se refiere al uso de solución salina fisiológica, por ejemplo, para eliminar los componentes sanguíneos y otro tejido innecesario, y similares, en la zona en la que se va a aplicar la composición de la presente invención. Después de la irrigación, el área afectada se seca, por ejemplo, limpiando cualquier componente líquido innecesario restante, y similares, seguido de la aplicación de la composición de la presente invención.

En la presente invención, "condropatía" se refiere a una enfermedad que aparece debido a que el cartílago, el tejido del cartílago y/o el tejido de la articulación (tal como la membrana sinovial, la cápsula articular o el hueso subcondral) han sido lesionados por una irritación mecánica o una respuesta inflamatoria. Un "tratamiento de una enfermedad del cartílago" se refiere al alivio, la mejora y/o la curación de los diversos síntomas del tejido que ha sido lesionado por una irritación mecánica o una respuesta inflamatoria. Por ejemplo, en los casos de artrosis, se produce la aparición de los síntomas combinados tales como el desgaste del cartílago articular, la degeneración del tejido del cartílago, la inflamación de la membrana sinovial o el dolor asociado con la inflamación. Por otro lado, en los casos de periartrosis escapulohumeral, los síntomas consisten principalmente en la inflamación de la membrana sinovial y de la cápsula articular, así como el dolor asociado con los mismos, mientras que no se observa un desgaste ni una degeneración del cartílago. Aunque el mecanismo de aparición de la artritis reumatoide no se comprende totalmente, se cree que el tejido sinovial y el tejido del cartílago son destruidos por las citocinas inflamatorias resultantes de una respuesta autoinmune. De esta forma, una condropatía es una enfermedad que se presenta con unos síntomas combinados, y es necesario que los fármacos para el tratamiento de la misma tengan efectos combinados, incluyendo la protección del cartílago frente al desgaste, la inhibición de los cambios degenerativos en el cartílago debido al desgaste o la inflamación, la reparación de las lesiones del cartílago y la inhibición de la inflamación y el dolor. La "composición que contiene una sal metálica monovalente del ácido algínico con una baja cantidad de endotoxinas" de la presente invención tiene los efectos de proteger el cartílago de la irritación mecánica, inhibir los cambios degenerativos en el cartílago causados por el desgaste o una inflamación, reparar las lesiones del cartílago e inhibir la inflamación y el dolor del tejido articular. Como resultado, la composición es capaz de inhibir la progresión de la condropatía, y de aliviar, mejorar y/o curar los síntomas. En particular, la composición es útil para el tratamiento de la artrosis, para el tratamiento de la periartrosis escapulohumeral y para aliviar el dolor articular asociado con la artritis reumatoide.

Además, "inyección en una articulación" se refiere a la inyección de una composición líquida que tiene fluidez, por ejemplo, en una cavidad articular, en la bolsa sinovial o el periténón. En el caso de su uso para el tratamiento de la artrosis, la composición se inyecta preferentemente en una cavidad articular. Adicionalmente, aunque la artrosis puede aparecer en diversas articulaciones del cuerpo, incluyendo las de las rodillas, los hombros, las caderas, la zona lumbar, los tobillos, las muñecas y los dedos, la composición de la presente invención puede ser aplicada en cualquiera de estas articulaciones.

2. Sal metálica monovalente de ácido algínico

La "sal metálica monovalente del ácido algínico" contenida en la composición para la regeneración del cartílago o el tratamiento de una condropatía de la presente invención es una sal soluble en agua formada por un intercambio iónico entre un átomo de hidrógeno de un ácido carboxílico en la posición 6 del ácido algínico y un ión metálico monovalente tal como Na^+ o K^+ . Aunque algunos ejemplos específicos de sales metálicas monovalentes del ácido algínico incluyen alginato de sodio y alginato de potasio, es particularmente preferible el alginato de sodio, que puede adquirirse en forma de un producto disponible comercialmente. Una solución de una sal metálica monovalente del ácido algínico forma un gel cuando se mezcla con un agente de reticulación.

El "ácido algínico" usado en la presente invención es un polisacárido biodegradable de alto peso molecular, esto es, un polímero obtenido mediante la polimerización lineal de dos tipos de ácidos urónicos en forma de ácido D-manurónico (M) y ácido L-glurónico (G). Más específicamente, el ácido algínico es un copolímero en bloque en el que una fracción de homopolímero del ácido D-manurónico (fracción MM), una fracción de homopolímero del ácido L-glurónico (fracción GG) y una fracción en la que están dispuestas aleatoriamente el ácido D-manurónico y el ácido L-glurónico (fracción MG), están unidas arbitrariamente. La proporción combinada entre el ácido D-manurónico y el ácido L-glurónico del ácido algínico (proporción M/G), que varía principalmente según el tipo de alga o de otro organismo que sirve como el origen del mismo, se ve afectada por el hábitat y la temporada de ese organismo, y se prolonga en un amplio intervalo desde un gran tipo G que tiene una proporción M/G de aproximadamente 0,4, hasta un gran tipo M que tiene una proporción M/G de aproximadamente 5.

Una sal metálica monovalente del ácido algínico es un polisacárido, y aunque es difícil de determinar de forma precisa el peso molecular, generalmente tiene un peso molecular medio en peso de entre 10.000 y 10.000.000 y preferentemente de entre 50.000 y 3.000.000. Dado que el efecto de regeneración del cartílago en las lesiones del cartílago, y particularmente el efecto de regeneración del cartílago hialino, resulta inferior si el peso molecular es excesivamente bajo, la sal metálica monovalente del ácido algínico usada en la presente invención tiene preferentemente un peso molecular medio en peso de 500.000 o más. En particular, el alginato de sodio que tiene un peso molecular medio en peso de 500.000 o más tiene el inesperado efecto de regenerar el cartílago hialino incluso en el estado de no contener células incorporadas, y es adecuado para su uso como una composición para la regeneración del cartílago. Además, dado que este efecto de regeneración del cartílago también contribuye ventajosamente a la reparación de las lesiones del cartílago en una condropatía, también es adecuado para su uso como una composición para el tratamiento de una condropatía. En la actualidad se observaron unos efectos terapéuticos superiores para el ácido algínico de alto peso molecular en comparación con el ácido algínico de bajo peso molecular en un modelo de artrosis de conejo. El alginato de sodio que tiene un peso molecular medio en peso de entre 1.000.000 y 1.700.000, determinado mediante una cromatografía de filtración en gel, mostró unos efectos inhibidores del cambio degenerativo en el cartílago, unos efectos protectores del cartílago y unos efectos reparadores del cartílago superiores en comparación con el alginato de sodio que tiene un peso molecular de 410.000. En el caso del cálculo del peso molecular de un polisacárido mediante una cromatografía de filtración en gel, normalmente existe un potencial error de medición de entre el 10 y el 20 %. Por ejemplo, un peso molecular de 400.000 puede fluctuar en el intervalo de entre 320.000 y 480.000, un peso molecular de 500.000 puede fluctuar en el intervalo de entre 400.000 y 600.000, y un peso molecular de 1.000.000 puede fluctuar en el intervalo de entre 800.000 y 1.200.000. Por lo tanto, el intervalo preferible de peso molecular medio en peso de una sal metálica monovalente del ácido algínico para que sus efectos sobre el cartílago sean particularmente superiores es de al menos 500.000 o más, más preferentemente de 650.000 o más, e incluso más preferentemente de 800.000 o más. Además de ser difícil de producir, dado que se producen problemas tales como la viscosidad cuando se prepara una solución acuosa que tiene una solubilidad excesivamente alta, o que disminuye si el peso molecular es excesivamente alto, el peso molecular medio en peso es preferentemente de 5.000.000 o menor, y más preferentemente de 3.000.000 o menor.

Dado que las sustancias con un elevado peso molecular con un origen natural normalmente no tienen un único peso molecular, sino que más bien consisten en un agregado de moléculas que tienen diversos pesos moleculares, el peso molecular se mide en forma de una distribución de pesos moleculares que tiene un cierto intervalo. Una técnica de medición típica es una cromatografía de filtración en gel. Algunos ejemplos típicos de la información obtenida a partir de la distribución de pesos moleculares determinada mediante una cromatografía de filtración en gel incluyen el peso molecular medio en peso (M_w), el peso molecular medio en número (M_n) y el cociente de varianzas (M_w/M_n).

El peso molecular medio en peso enfatiza la contribución del peso molecular medio de los polímeros que tienen un gran peso molecular, y está representado con la siguiente fórmula:

$$M_w = \frac{\sum(W_i M_i)}{W} = \frac{\sum(H_i M_i)}{\sum(H_i)}$$

El peso molecular medio en número se calcula dividiendo el peso total de los polímeros por el número total de polímeros.

$$M_n = \frac{W}{\sum N_i} = \frac{\sum(M_i N_i)}{\sum N_i} = \frac{\sum(H_i)}{\sum(H_i/M_i)}$$

Aquí, W representa el peso total de todos los polímeros, W_i representa el peso total del polímero i -ésimo, M_i representa peso molecular en el tiempo de elución i -ésimo, N_i representa el número de pesos moleculares M_i , y H_i representa la altura en el tiempo de elución i -ésimo.

5 Dado que se considera que los efectos de regeneración del cartílago (y particularmente los efectos de regeneración del cartílago hialino) en las lesiones del cartílago, los efectos de reparación del cartílago, los efectos inhibidores de los cambios degenerativos del cartílago y/o los efectos protectores del cartílago en el tratamiento de una condropatía están ampliamente contribuidos por las especies particulares que tienen unos grandes pesos moleculares, puede usarse el peso molecular medio en peso como un indicador del peso molecular.

10 Se sabe que se producen diferencias en los valores según el procedimiento de medición de los pesos moleculares de las sustancias de alto peso molecular de origen natural (ejemplo de ácido hialurónico: Chikako Yomota et al., Bull. Natl. Health Sci., Vol. 117, páginas 135-139 (1999), Chikako Yomota et al., Bull. Natl. Health Sci., Vol. 121, páginas 30-33 (2003)). Los procedimientos para la medición del peso molecular del alginato descritos en la bibliografía incluyen un procedimiento en el que el peso molecular se calcula a partir de la viscosidad intrínseca, y un procedimiento en el que el peso molecular se calcula mediante una cromatografía de exclusión por tamaños con una detección de la dispersión de la luz láser de ángulo múltiple (SEC-MALLS) (ASTM F2064-00 (2006), publicado por
15 ASTM International). Adicionalmente, en la bibliografía también se describe que, en la medición del peso molecular mediante una cromatografía de exclusión por tamaños (una cromatografía de filtración en gel), el cálculo a partir de una curva de calibrado utilizando pululano para la sustancia patrón es insuficiente, y se recomienda que se use la medición del peso molecular junto con un detector de dispersión de la luz láser de ángulo múltiple (MALLS) (a saber,
20 una medición mediante SEC-MALLS). Además, también hay ejemplos del uso de los pesos moleculares determinados mediante una SEC-MALLS usados como especificaciones de catálogos de alginatos (FMC Biopolimer Inc., PRONOVA™ Sodium Alginates Catalog).

25 Los inventores de la presente invención encontraron aquí que había diferencias en los efectos terapéuticos del alginato de sodio con diferentes pesos moleculares en un modelo de artrosis, y midieron los pesos moleculares de estos alginatos mediante una cromatografía de filtración en gel y mediante una SEC-MALLS. Como resultado, se demostró que los pesos moleculares determinados mediante una cromatografía de filtración en gel mostraban una mayor correlación con la viscosidad y los efectos terapéuticos de los alginatos. A saber, se descubrió que en lugar del procedimiento recomendado generalmente de SEC-MALLS, se averiguó que el peso molecular determinado mediante una cromatografía de filtración en gel era adecuado como parámetro para especificar el intervalo preferible
30 de pesos moleculares de los alginatos usados en una composición para la regeneración del cartílago o para el tratamiento de una condropatía. Por lo tanto, en el caso de especificar el peso molecular de un alginato en la presente memoria descriptiva, el peso molecular es el peso molecular medio en peso calculado mediante una cromatografía de filtración en gel, salvo que específicamente se indique de otro modo.

35 Las condiciones preferibles para una cromatografía de filtración en gel según se indican en los ejemplos. Una condición típica consiste en el uso de una curva de calibrado utilizando pululano como la sustancia patrón. El pululano que tiene un peso molecular de al menos 1.600.000, 788.000, 404.000, 212.000 y 112.000 se usa preferentemente como el pululano usado como la sustancia patrón. Además, también puede especificarse el eluido (solución de nitrato de sodio 200 mM), las condiciones de la columna y similares. Las condiciones de la columna consisten preferentemente en el uso de un relleno basado en resina de polimetacrilato y el uso de al menos una columna que tenga un corte de peso molecular de 10.000.000 o más. Un ejemplo típico de una columna es la TSKgel GMPWx1 (diámetro: 7,8 mm x 300 mm) (Tosoh Corp.).
40

Aunque una sal metálica monovalente del ácido algínico tiene un gran peso molecular y una elevada viscosidad cuando se aísla inicialmente a partir de las algas pardas, el peso molecular disminuye y la viscosidad se reduce durante el transcurso de experimentar un termosecado, una liofilización, una purificación y similares. Por lo tanto, las sales metálicas monovalentes del ácido algínico que tienen diferentes pesos moleculares pueden ser producidas mediante el adecuado control de la temperatura en cada etapa de producción. Las sales metálicas monovalentes del ácido algínico que tienen un elevado peso molecular se obtienen mediante el control de la temperatura en cada una de las etapas de producción para que sea relativamente baja, mientras que las sales metálicas monovalentes del ácido algínico que tienen un bajo peso molecular se obtienen mediante el control de la temperatura en cada etapa
50 de producción para que sea relativamente alta. Además, también pueden producirse sales metálicas monovalentes del ácido algínico que tienen unos pesos moleculares diferentes mediante una técnica tal como el material de partida, o mediante el fraccionamiento según el peso molecular en el procedimiento de producción. Además, también puede obtenerse una sal metálica monovalente del ácido algínico que tenga un peso molecular mezclando una sal metálica monovalente del ácido algínico producida según los diversos procedimientos de producción con un lote diferente de una sal metálica monovalente del ácido algínico que tenga un peso molecular o una viscosidad diferente después de haber sido medido el peso molecular o la viscosidad de la misma.
55

Aunque el ácido algínico usado en la presente invención puede ser de origen natural o sintético, preferentemente procede de un origen natural. Algunos ejemplos de ácidos algínicos naturales incluyen los extraídos a partir de las algas pardas. Aunque las algas pardas que contienen ácido algínico se encuentran fundamentalmente a lo largo de los litorales de todo el mundo, las algas que pueden usarse realmente como materiales de partida del ácido algínico están limitadas, algunos ejemplos típicos de las mismas incluyen las especies de *Lessonia* que se encuentran en
60

Sudamérica, las especies de *Macrocystis* que se encuentran en Norteamérica, a las especies de *Laminaria* y *Ascophyllum* que se encuentran en Europa, y las especies de *Durvillea* que se encuentran en Australia. Algunos ejemplos de algas paradas que sirven como materiales de partida del ácido alginico incluyen especies de *Lessonia*, especies de *Macrocystis*, especies de *Laminaria*, especies de *Ascophyllum*, especies de *Durvillea*, especies de *Eisenia* y especies de *Ecklonia*.

3. Tratamiento para la reducción de las endotoxinas

La sal metálica monovalente del ácido alginico contenida en la composición para la regeneración del cartilago o para el tratamiento de una condropatía de la presente invención es una sal metálica monovalente del ácido alginico con un bajo contenido en endotoxinas. Un bajo contenido en endotoxinas se refiere a que el nivel de endotoxinas de la misma se ha reducido sustancialmente hasta el punto en que no induce inflamación ni fiebre. A saber, la sal metálica monovalente del ácido alginico ha sido sometida a un tratamiento de reducción de endotoxinas. Sorprendentemente se averiguó que sometiénola a este tratamiento de reducción de endotoxinas, además de ser capaz de mejorar la acción regenerativa del cartilago de la composición cuando se aplica en una lesión del cartilago, puede favorecerse la regeneración del hueso subcondral y potenciarse la resistencia mecánica del área afectada. A saber, utilizando un ácido alginico con un bajo contenido en endotoxinas en la composición de la presente invención, puede obtenerse una composición que tiene una elevada bioafinidad, y que no induce degeneración ni respuestas inflamatorias en el cartilago circundante.

El tratamiento de reducción de las endotoxinas puede llevarse a cabo mediante un procedimiento conocido o un procedimiento conforme con el mismo. Por ejemplo, este tratamiento puede llevarse a cabo mediante el procedimiento de Suga et al., que implica la purificación del hialuronato de sodio (véase, por ejemplo, la Solicitud de Patente Japonesa Abierta a Consulta por el Público nº H9-324001), el procedimiento de Yoshida et al., que implica la purificación del β 1,3-glucano (véase, por ejemplo, la Solicitud de Patente Japonesa Abierta a Consulta por el Público nº H8-269102), el procedimiento de William et al., que implica la purificación de un biopolímero tal como alginato o goma gelan (véase, por ejemplo, la Traducción Japonesa Publicada nº 2002-530440 de la Publicación Internacional PCT), el procedimiento de James et al., que implica la purificación del polisacárido (véase, por ejemplo, la Publicación Internacional nº 93/13136 folleto), el procedimiento de Lewis et al. (véase, por ejemplo, la Patente de EE.UU. nº 5589591), el procedimiento de Hermanfrank et al., que implica la purificación del alginato (véase, por ejemplo, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* (1994), 40: 638-643) o un procedimiento conforme con los mismos. El tratamiento de reducción de las endotoxinas de la presente invención no está limitado a los mismos, sino que bien puede llevarse a cabo mediante cualquier procedimiento conocido tal como una limpieza, una purificación utilizando una filtración con un filtro (filtro para la eliminación de endotoxinas o filtro de electrificación), una ultrafiltración o una columna (tal como una columna de adsorción por afinidad de endotoxinas, una columna de filtración en gel o una columna de intercambio iónico), la adsorción a una sustancia hidrófoba, una resina o carbón activo y similares, el tratamiento con un disolvente orgánico (tal como una extracción con un disolvente orgánico o una precipitación o una deposición mediante la adición de un disolvente orgánico), el tratamiento con un tensioactivo (véase, por ejemplo, la Solicitud de Patente Japonesa Abierta a Consulta por el Público nº 2005-036036) o una adecuada combinación de los mismos. Puede combinarse adecuadamente un procedimiento conocido, tal como una separación centrífuga, con estas etapas de tratamiento. El tratamiento de reducción de las endotoxinas se selecciona preferentemente adecuadamente según el tipo de ácido alginico.

El nivel de endotoxinas puede ser confirmado mediante un procedimiento conocido, y puede medirse utilizando un procedimiento conocido tal como un procedimiento que utiliza un reactivo de limulus (LAL) o un procedimiento que utiliza un set Endospecy (marca registrada) ES-24S (Seikagaku Corp.). Aunque no hay ninguna limitación en particular con respecto al procedimiento de tratamiento de las endotoxinas del ácido alginico contenido en la composición de la presente invención, el contenido en endotoxinas de la sal metálica monovalente del ácido alginico en el caso de la medición de las endotoxinas utilizando un reactivo de limulus (LAL) es preferentemente de 500 unidades de endotoxinas (UE)/g o menos, más preferentemente de 100 UE/g o menos, o incluso más preferentemente de 50 UE/g o menos, y particularmente preferentemente de 30 UE/g o menos, como resultado del mismo. El alginato de sodio que ha experimentado un tratamiento de reducción de las endotoxinas puede ser adquirido en forma de productos disponibles comercialmente tales como Sea Matrix (esterilizado) (Kimica Corp., Mochida International Ltd.) y Pronova™ UP LVG (FMC).

4. Preparación de la solución de la sal metálica monovalente del ácido alginico

La composición para la regeneración del cartilago o para el tratamiento de una condropatía puede ser preparada utilizando una solución de una sal metálica monovalente del ácido alginico. La solución de una sal metálica monovalente del ácido alginico puede prepararse mediante un procedimiento conocido o un procedimiento conforme con el mismo. A saber, la sal metálica monovalente del ácido alginico usada en la presente invención puede ser producida mediante un procedimiento conocido tal como un procedimiento ácido o un procedimiento con calcio utilizando las previamente descritas algas pardas. Más específicamente, después de la extracción a partir de estas algas pardas utilizando una solución acuosa alcalina, tal como una solución acuosa de carbonato de sodio, por ejemplo, puede obtenerse el ácido alginico añadiendo un ácido (tal como ácido clorhídrico o ácido sulfúrico), y puede obtenerse una sal del ácido alginico mediante un intercambio iónico del ácido alginico. Después se lleva a cabo el tratamiento de reducción de las endotoxinas como se ha descrito previamente. No hay ninguna limitación en

particular sobre el disolvente de la sal del ácido algínico siempre que sea un disolvente que pueda ser aplicado *in vivo*, y algunos ejemplos de dichos disolventes incluyen agua purificada, agua destilada, agua para intercambio iónico, agua Milli-Q, solución salina fisiológica y solución salina tamponada con fosfato (PBS). Estas son preferentemente estabilizadas y preferentemente sometidas a un tratamiento de reducción de las endotoxinas. Por ejemplo, puede usarse agua Milli-Q agua después de su esterilización mediante una filtración. Además, el procedimiento para la obtención de la composición de la presente invención se lleva a cabo en un entorno que tiene unos bajos niveles de endotoxinas y de bacterias. Por ejemplo, el procedimiento se lleva a cabo preferentemente en una mesa de trabajo limpia utilizando aparatos esterilizados, y los aparatos usados pueden ser tratados con un agente de eliminación de endotoxinas disponible comercialmente.

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

5. Viscosidad de la composición para la regeneración del cartílago o el tratamiento de una condropatía

15 Aunque no hay ninguna limitación en particular sobre la viscosidad de la composición para la regeneración del cartílago de la presente invención, siempre que se obtengan los efectos de la presente invención, preferentemente es de entre 400 y 20.000 mPa • s. La viscosidad de la composición de la presente invención puede ser ajustada hasta una viscosidad adecuada utilizando, por ejemplo, el disolvente mencionado anteriormente. Si la viscosidad está en este intervalo, la adherencia a una lesión del cartílago es favorable y la composición puede ser inyectada en una cavidad articular o una lesión del cartílago con una jeringa, y similares. Además, si la viscosidad de la composición para la regeneración del cartílago es de aproximadamente 2.000 mPa • s o más, se mejora adicionalmente la adherencia a una lesión del cartílago, y si la viscosidad es de aproximadamente 5.000 mPa • s o más en particular, incluso si la abertura de un defecto del cartílago está orientada hacia abajo, tal como en el caso de una manipulación artroscópica de una lesión del cartílago en la superficie de una articulación femoral humana, por ejemplo, la composición de la presente invención puede ponerse en contacto con la superficie de la lesión del cartílago inyectando la composición de la presente invención en el defecto del cartílago y dejando que se adhiera al mismo durante al menos un minuto en ausencia de fijación. La superficie de la composición puede fijarse según sea necesario durante el tiempo que se está adhiriendo. La adherencia a la lesión del cartílago mejora adicionalmente al aumentar la viscosidad, y en el caso de una viscosidad de 10.000 mPa • s, por ejemplo, la composición puede adherirse sin fijación durante un periodo de tiempo más largo en comparación con una viscosidad de 5.000 mPa • s. Por lo tanto, en el caso de que la composición de la presente invención se aplique a una lesión del cartílago en un estado en el que la abertura de un defecto del cartílago o la abertura de un orificio formado en una lesión del cartílago o en un defecto del cartílago esté inclinada u orientada hacia abajo, la composición de la presente invención se adhiere a la lesión del cartílago durante al menos 5 segundos, preferentemente durante al menos 10 segundos, más preferentemente durante al menos 30 segundos, y particularmente preferentemente durante al menos 1 minuto sin la utilización de un medio de fijación. Como resultado del ajuste de la viscosidad de la misma, la composición de la presente invención puede fijarse durante un tiempo suficiente hasta que se aplique un medio de fijación a la superficie de la composición. Aquí, "adherencia a una lesión del cartílago" se refiere a que la composición de la presente invención es retenida en la lesión del cartílago sin salirse de la misma. De esta forma, como resultado del ajuste de la viscosidad de la misma, la composición de la presente invención ofrece la ventaja de permitir la realización del tratamiento mediante un procedimiento simple en forma de una inyección, incluso si el área afectada está posicionada de tal forma que es difícil llevar a cabo el tratamiento por parte de un cirujano, tal como cuando el área afectada está orientada hacia abajo.

45 Por otro lado, la composición de la presente invención es inyectada más fácilmente con una jeringa y similares cuando la viscosidad de la misma es de aproximadamente 20.000 mPa • s o menos. Aunque la composición puede ser inyectada con una jeringa y similares incluso si, por ejemplo, la viscosidad de la misma es de aproximadamente 20.000 mPa • s, en los casos en los que la inyección es difícil debido a la excesivamente alta viscosidad, la composición de la presente invención puede ser aplicada sobre la superficie de una lesión del cartílago utilizando otro medio. Desde el punto de vista de facilidad de manipulación de la jeringa, la viscosidad de la composición de la presente invención es preferentemente de 20.000 mPa • s o menos, y más preferentemente de 15.000 mPa • s o menos. Por lo tanto, la viscosidad de la composición de la presente invención aplicada sobre una lesión del cartílago en un estado en el que una abertura de un defecto del cartílago o una abertura de un orificio formado en una lesión del cartílago o en un defecto del cartílago está inclinado u orientado hacia abajo es preferentemente de aproximadamente 2.000 mPa • s o más desde el punto de vista de la adherencia, preferentemente de aproximadamente 20.000 mPa • s o menos desde punto de vista de la facilidad de manipulación de la composición, y preferentemente de entre 3.000 y 15.000 mPa • s, más preferentemente de entre 4.000 y 10.000 mPa • s, y particularmente preferentemente 5.000 y 6.000 mPa • s.

60 Si la viscosidad de la composición de la presente invención es de aproximadamente 400 mPa • s o más, la composición es capaz de mostrar adecuadamente los efectos de la presente invención al ser aplicada sobre una lesión del cartílago. Por ejemplo, en el caso de ser capaz de funcionar la presente invención en un estado en el que el lado que contiene una abertura de un defecto del cartílago está orientado hacia arriba, la composición de la presente invención puede ser inyectada en la lesión del cartílago para que entre en contacto con la composición de

la presente invención con la superficie de la lesión del cartílago, seguido de la fijación de la superficie de la composición. La inyección con una jeringa y similares puede llevarse a cabo fácilmente debido a la baja viscosidad de la composición. En el caso de que la viscosidad de la composición sea de aproximadamente 5.000 mPa · s, por ejemplo, la composición puede ser aplicada en la totalidad de la lesión del cartílago formando uno o más orificios extremadamente pequeños en la lesión del cartílago, tal como en el caso en el que hay cartílago residual en la zona de la lesión del cartílago.

Aunque no hay ninguna limitación en particular sobre la viscosidad en el caso de inyectar la composición para el tratamiento de una condropatía de la presente invención en una articulación, siempre que se obtengan los efectos terapéuticos sobre la condropatía, la viscosidad es preferentemente de entre 100 y 20.000 mPa · s. La viscosidad es preferentemente de entre 200 y 15.000 mPa · s, más preferentemente de entre 400 y 10.000 mPa · s, y particularmente preferentemente de entre 1.000 y 6.000 mPa · s. El uso de una viscosidad adecuada hace posible mostrar el efecto de compensación de la función de almohadilla del líquido sinovial, haciendo así posible que muestre el efecto del tratamiento de una condropatía en el estado de estar dispersada en el líquido sinovial.

La viscosidad de la composición para la regeneración del cartílago o el tratamiento de una condropatía puede ajustarse, por ejemplo, controlando la concentración del ácido algínico en la solución de una sal metálica monovalente del ácido algínico o controlando el peso molecular del ácido algínico.

La viscosidad de la solución de la sal metálica monovalente del ácido algínico aumenta cuando la concentración de ácido algínico en la solución es alta, y disminuye cuando la concentración de ácido algínico en la solución es baja. Aunque no es posible establecerla unívocamente como resultado de verse afectada por el peso molecular, la concentración preferible de ácido algínico en la solución del ión metálico monovalente del ácido algínico es de entre aproximadamente el 1 y el 5 % p/v, más preferentemente de entre el 1,5 y el 3 % p/v, y particularmente preferentemente de entre el 2 y el 2,5 % p/v.

La sal metálica monovalente del ácido algínico tiene inicialmente un peso molecular elevado y una viscosidad elevada cuando es extraída a partir de las algas pardas, a pesar de que la concentración es constante, el peso molecular disminuye durante el transcurso del termosecado, la liofilización, la purificación y similares, dando finalmente como resultado una viscosidad que es relativamente baja. La viscosidad varía constantemente incluso para un ácido algínico extraído a partir de las mismas algas pardas. Además, los valores de la viscosidad medidos también varían dependiendo del instrumento de medición y de las condiciones de la medición. Por lo tanto, una solución de una sal metálica monovalente del ácido algínico que tiene una adherencia superior a una lesión del cartílago y para la cual se ha reducido nivel de endotoxinas de la misma, está incluida en el ámbito de la presente invención.

Puede seleccionarse una sal metálica monovalente del ácido algínico que tenga un elevado peso molecular para obtener una composición que tiene una adherencia superior a un área afectada y una elevada viscosidad a partir de una solución de una sal metálica monovalente del ácido algínico que tenga una baja concentración.

Dado que la viscosidad de la solución de una sal metálica monovalente del ácido algínico se ve afectada por la proporción M/G, el ácido algínico puede seleccionarse adecuadamente para que tenga una proporción M/G más preferible para la viscosidad de la solución y similares. La proporción M/G del ácido algínico usado en la presente invención es de entre aproximadamente 0,4 y 4,0, preferentemente de entre aproximadamente 0,8 y 3,0 y más preferentemente de entre aproximadamente 1,0 y 1,6.

Como se ha descrito previamente, dado que la proporción M/G está determinada principalmente por el tipo de alga, el tipo de alga parda usada como material de partida tiene un efecto sobre la viscosidad de la solución de la sal metálica monovalente del ácido algínico. El ácido algínico usado en la presente invención procede preferentemente de algas pardas de los géneros *Lessonia*, *Macrocystis*, *Laminaria*, *Ascophyllum* y *Durvillea*, más preferentemente procede de algas pardas del género *Lessonia*, y particularmente preferentemente de algas pardas de *Lessonia nigrescens*.

La presente invención usa una composición que no contiene células para facilitar el procedimiento quirúrgico, así como para reducir el riesgo de infección por virus y similares atribuible al cuerpo o al procedimiento de cultivo sin colocar una excesiva carga en el cuerpo a través de dichos procedimientos al recoger condrocitos, periostio o médula ósea. Un ejemplo preferible de dicha composición es una composición para la regeneración del cartílago que tiene una viscosidad de entre 400 y 20.000 mPa · s y que tienen una fluidez para la curación de un área afectada mediante la aplicación en una lesión del cartílago, que comprende alginato de sodio con un bajo contenido en endotoxinas que tiene un peso molecular medio en peso determinado mediante una cromatografía de filtración en gel de 500.000 o más. Además, la composición para el tratamiento de una condropatía de la presente invención es una composición que tiene como principio activo de la misma una sal metálica monovalente del ácido algínico con un bajo contenido en endotoxinas, y se basa en el hallazgo de que el propio ácido algínico tiene un efecto terapéutico sobre una condropatía. Un ejemplo de una composición terapéutica preferible es una composición para el tratamiento de una condropatía que es inyectada en una articulación, que comprende una composición exenta de células que contiene como principio activo de la misma alginato de sodio con un bajo contenido en endotoxinas que tiene un peso molecular medio en peso determinado mediante una cromatografía de filtración en gel de 500.000 o

más, y es capaz de mostrar unos efectos terapéuticos que son superiores a los de las preparaciones de ácido hialurónico usadas en la técnica anterior.

7. Gelificación de la superficie de la composición

5 En la presente invención, una composición que contiene una solución de una sal metálica monovalente del ácido algínico puede ser aplicada sobre una lesión del cartílago, y puede aplicarse un agente de reticulación a la superficie de la composición. La gelificación de la superficie de la composición para solidificar la superficie hace posible prevenir de forma eficaz fugas de la composición desde la lesión del cartílago.

10 No hay ninguna limitación en particular sobre el agente de reticulación siempre que sea capaz de solidificar una superficie de una solución de una sal metálica monovalente del ácido algínico reticulando esa solución, y algunos ejemplos incluyen compuestos de iones metálicos divalentes o más tales como Ca^{2+} , Mg^{2+} , Ba^{2+} o Sr^{2+} , y reactivos de reticulación que tienen entre 2 y 4 grupos amino en una molécula de los mismos. Algunos ejemplos de los compuestos de iones metálicos divalentes o más incluyen CaCl_2 , MgCl_2 , CaSO_4 y BaCl_2 , mientras que algunos ejemplos específicos de los reactivos de reticulación que tienen entre 2 y 4 grupos amino en una molécula de los mismos incluyen diaminoalcanos que opcionalmente tienen un grupo lisilo ($-\text{COCH}(\text{NH}_2)-(\text{CH}_2)_4-\text{NH}_2$) en un átomo de nitrógeno, a saber, derivados que forman grupos lisilamino como resultado de la sustitución de un grupo diaminoalcano y un amino de los mismos por un grupo lisilo. Aunque algunos ejemplos específicos de los mismos incluyen diaminoetano, diaminopropano y N-(lisil)-diaminoetano, es particularmente preferible una solución de CaCl_2 por razones tales como la facilidad de adquisición y la fuerza del gel.

20 No hay ninguna limitación en particular sobre el procedimiento usado para la adición de un ión metálico divalente o más en la superficie de la composición, y un ejemplo de dicho procedimiento consiste en la aplicación de una solución de un ión metálico divalente o más en la superficie de la composición con una jeringa o un pulverizador. El agente de reticulación puede ser aplicado en la superficie de la composición de la presente invención tanto después como simultáneamente con la aplicación de la composición de la presente invención en un defecto del cartílago.

25 La cantidad de agente de reticulación aplicada se ajusta preferentemente adecuadamente dependiendo del tamaño del defecto en el que se aplica la composición de la presente invención. El agente de reticulación penetra gradualmente en el interior desde la superficie de la composición en la cual es aplicado después de que progrese la reticulación. La cantidad de agente de reticulación aplicada se ajusta de forma que no esté en exceso, para prevenir que el agente de reticulación tenga un efecto excesivamente fuerte en el sitio en el que la composición de la presente invención entra en contacto con una lesión del cartílago. No hay ninguna limitación en particular sobre la cantidad de ión metálico divalente o más aplicado siempre que sea capaz de solidificar la superficie la composición que contiene una sal metálica monovalente del ácido algínico. Sin embargo, en el caso de añadir una solución de CaCl_2 100 mM, por ejemplo, la cantidad añadida es preferentemente de entre aproximadamente 0,3 y 0,6 ml en el caso de un defecto que tiene un diámetro de aproximadamente 5 mm y una profundidad de aproximadamente 2 mm, y la dosis también puede ser determinada proporcionalmente al área de la superficie de la parte afectada. Por ejemplo, la cantidad añadida es preferentemente de entre aproximadamente 1 y 12 ml, y más preferentemente de entre aproximadamente 2 y 10 ml en el caso de un defecto que tiene una anchura (10 mm x 20 mm) y una profundidad de aproximadamente 5 mm. La cantidad añadida puede ser ajustada adecuadamente mientras se observa el estado de la lesión del cartílago. El agente de reticulación puede ser aplicado, por ejemplo, de forma continua y aplicándolo lentamente en la superficie de la composición que contiene una sal metálica monovalente del ácido algínico durante entre varios y diez o más segundos.

40 Además, al contener la composición de la presente invención un agente de reticulación mediante el cual se favorece la gelificación por cambios medioambientales tales como una diferencia de tiempo, una diferencia de temperatura o el contacto con los iones de calcio del interior del cuerpo, puede obtenerse una composición que mantiene un estado líquido antes de su administración, y gelifica espontáneamente después de su administración en el cuerpo. Algunos ejemplos de dichos agentes de reticulación incluyen gluconato de calcio, CaSO_4 y alginato de calcio.

45 Aquí, en el caso de que haya calcio contenido en el agente de reticulación, se sabe que una mayor concentración de calcio da como resultado una rápida gelificación y la formación de un gel más duro. Sin embargo, dado que el calcio es citotóxico, si la concentración del mismo es excesivamente alta existe el riesgo de que tenga un efecto perjudicial sobre la acción regenerativa del cartílago de la composición para la regeneración del cartílago o el tratamiento de una condropatía de la presente invención. Por lo tanto, en el caso de utilizar una solución de CaCl_2 para solidificar la superficie de una composición que contiene una sal metálica monovalente del ácido algínico, por ejemplo, la concentración de calcio es preferentemente de entre 25 y 200 mM y más preferentemente de entre 50 y 100 mM.

50 Aquí, las microesferas de alginato son producidas, por ejemplo, dejando gotear una solución de alginato de sodio en una solución de CaCl_2 seguido de la gelificación. Se sabe que las microesferas de alginato con células incorporadas se usan en la regeneración del cartílago (véase, por ejemplo, las Referencias 2 y 3). Sin embargo, aunque es necesario que las microesferas de alginato sean aplicadas presionando sobre un defecto del cartílago, dado que es necesario producir unas microesferas que se adapten al tamaño del defecto, su uso en el entorno clínico actual es técnicamente difícil. Además, en el caso de utilizar una solución de CaCl_2 como agente de reticulación, dado que los iones de Ca de la superficie de las microesferas están en contacto con la superficie de la lesión del cartílago,

también está el problema de la citotoxicidad causada por el calcio. Por el contrario, dado que la composición de la presente invención está en forma de una solución, puede ser fácilmente aplicada en un defecto de cualquier forma, la totalidad de la lesión del cartílago es susceptible de ser cubierta con la composición, y la adherencia al defecto del cartílago es satisfactoria. Dado que la concentración de calcio en la zona en la que la composición entra en contacto con la superficie de la lesión del cartílago puede mantenerse en un nivel bajo, también existen pocos problemas con respecto a la citotoxicidad por calcio. Dado que el efecto del agente de reticulación sobre la superficie de la lesión del cartílago que está en contacto con la composición de la presente invención es pequeño, la composición de la presente invención es susceptible de ponerse fácilmente en contacto con las células y el tejido en las zonas de una lesión del cartílago en el cuerpo. Una vez que han pasado aproximadamente cuatro semanas desde que se aplicó sobre una lesión del cartílago, la composición de la presente invención se funde con el tejido hasta un grado en el que es indistinguible en la zona aplicada, mostrando por lo tanto una elevada bioafinidad.

Cuando se aplica la composición de la presente invención a una lesión del cartílago, si se aplica mezclándola en primer lugar con un agente de reticulación, de forma que gelifique la totalidad de la composición con el agente de reticulación, o proporcionando un agente de reticulación en la superficie de la composición, la composición de la presente invención puede ser curada en el área afectada y estar localizada en la misma en un estado que estará adherida a la lesión del cartílago cuando se aplique. Como resultado de la adherencia de la composición de la presente invención a una lesión del cartílago, los efectos sobre la regeneración del cartílago de la composición de la presente invención, y particularmente los efectos de regeneración del cartílago hialino, pueden mostrarse de una forma más potente.

8. Formulación y aplicación de una composición para la regeneración del cartílago o el tratamiento de una condropatía que contiene una sal metálica monovalente del ácido algínico

La composición para la regeneración del cartílago o el tratamiento de una condropatía de la presente invención se aplica sobre una lesión del cartílago de un mamífero humano o no humano tal como una vaca, un mono, un ave, un gato, un ratón, una rata, un cobaya, un hámster, un cerdo, un perro, un conejo, una oveja o un caballo, y se usa para favorecer la regeneración del cartílago o el tratamiento de una condropatía mediante su inyección en una articulación.

La forma de la composición para la regeneración del cartílago o el tratamiento de una condropatía de la presente invención es un líquido fluido, a saber, una solución. En la presente invención, la frase "que tiene fluidez" se refiere a que tiene una propiedad que causa que la forma de la misma cambie a una forma amorfa, y no requiere que la forma tenga constantemente la propiedad de fluir de la misma forma que un líquido, por ejemplo. La composición tiene una fluidez tal que es susceptible de ser precintada en una jeringa y similares e inyectada en un área afectada. La composición de la presente invención en forma de una solución puede ser aplicada fácilmente en una lesión del cartílago o en una articulación con una jeringa, una pipeta para gel o una jeringa especial. Además, es compatible con cualquier forma de la lesión o del defecto del cartílago, y es capaz de rellenar o entrar en contacto con la totalidad del defecto del cartílago.

La composición para la regeneración del cartílago de la presente invención muestra una acción regenerativa superior del cartílago, por ejemplo, en un defecto del cartílago del cartílago hialino en forma de cartílago articular. Además, la composición para el tratamiento de una condropatía de la presente invención muestra efectos terapéuticos sobre una condropatía tal como la artrosis ya que tiene efectos de reparación del cartílago, efectos que inhiben los cambios degenerativos del cartílago, efectos protectores del cartílago, efectos que inhiben la inflamación del tejido articular y/o efectos que suprimen el dolor atribuible a la inflamación del tejido articular.

Un aspecto de la composición para la regeneración del cartílago de la presente invención es una composición para la regeneración del cartílago hialino. Un objeto de una composición para la regeneración del cartílago hialino es regenerar el cartílago que tiene una elevada proporción de cartílago hialino en comparación con el cartílago fibroso, y pretende regenerar el tejido del cartílago rico en colágeno de tipo II y proteoglicano.

Además, un aspecto de la composición para el tratamiento de una condropatía de la presente invención es una composición para el tratamiento de la artrosis. En el caso de que una lesión del cartílago se extienda a lo largo de una zona amplia del cartílago articular en forma de artrosis, o cuando se desea el tratamiento de un tipo de lesión del cartílago observado frecuentemente en una fase comparativamente temprana de la artrosis, tal que la uniformidad de la superficie del cartílago está alterada y han comenzado los cambios degenerativos a pesar de que todavía no se han producido unos defectos del cartílago bien definidos, la composición de la presente invención se aplica preferentemente mediante una inyección en una cavidad articular y se deja dispersar por todo el líquido sinovial. El contacto de una sal metálica monovalente del ácido algínico con una lesión del cartílago favorece la reparación de la articulación en la lesión del cartílago, inhibe los cambios degenerativos causados por la inflamación y el desgaste, y protege el cartílago. Además, como resultado de que el principio activo en forma de una sal metálica monovalente del ácido algínico está dispersado por todo el líquido sinovial, se inhiben las respuestas inflamatorias del tejido circundante, incluyendo el líquido sinovial, y se muestran los efectos supresores del dolor. Al mismo tiempo, la presencia de una sal metálica monovalente del ácido algínico en el líquido sinovial cumple el papel de compensar la función del líquido sinovial al servir como cojín y lubricante.

Otro aspecto de la composición para el tratamiento de una condropatía de la presente invención es una composición para el tratamiento de la periartrosis escapulohumeral (periarthrosis humeroscapularis). La periartrosis escapulohumeral se presenta principalmente con inflamación de la membrana sinovial y de la cápsula articular acoplada con el dolor asociado con las mismas, y puede no observarse un desgaste ni una degeneración del cartílago. Dado que una sal metálica monovalente del ácido algínico muestra los efectos de inhibir las respuestas inflamatorias del tejido circundante, incluyendo el líquido sinovial, y la supresión del dolor, la periartrosis escapulohumeral puede ser tratada administrando la composición de la presente invención en la cavidad articular del hombro, la bolsa subacromial o la vaina del tendón muscular del bíceps.

Otro aspecto de la composición para el tratamiento de una condropatía de la presente invención es una composición para la supresión del dolor articular. El dolor articular es frecuentemente un problema en la artritis reumatoide además de en la artrosis, la periartrosis escapulohumeral y similares, como se ha descrito previamente. Un aspecto preferible de la presente invención es una composición para el tratamiento del dolor articular asociado con la artritis reumatoide, y particularmente es preferentemente una composición para la supresión del dolor en la articulación de la rodilla asociado con la artritis reumatoide crónica. Aunque el mecanismo de aparición de la artritis reumatoide aún no se comprende totalmente, se cree que el tejido sinovial y el tejido del cartílago son destruidos por citocinas inflamatorias resultantes de una respuesta autoinmune. Dado que una sal metálica monovalente del ácido algínico muestra efectos que inhiben las respuestas inflamatorias del tejido circundante, incluyendo el tejido sinovial, y suprimen el dolor, la composición de la presente invención es capaz de inhibir las respuestas inflamatorias y de suprimir el dolor asociado con las mismas mediante su administración en una articulación que padece una artritis reumatoide. Por otro lado, también es necesario suprimir la respuesta autoinmune con objeto de tratar la base de la artritis reumatoide, y todavía no se ha determinado si una sal metálica monovalente del ácido algínico tiene una acción inmunosupresora en un área afectada por la artritis reumatoide.

Otro aspecto de la composición para el tratamiento de una condropatía de la presente invención es una composición para el alivio, la mejora y/o la curación de los diversos síntomas asociados con una condropatía. En una condropatía, el cartílago, el tejido del cartílago y/o el tejido articular (tal como la membrana sinovial, la cápsula articular o el hueso subcondral) son lesionados por una irritación mecánica o una respuesta inflamatoria, y aparecen unos síntomas combinados tales como cambios degenerativos en el tejido del cartílago, inflamación de la membrana sinovial y del tejido articular, y dolor articular atribuible a la inflamación debida al desgaste y la irritación mecánica del cartílago articular junto con respuestas inflamatorias. Dado que la composición de la presente invención contiene como principio activo de la misma una sal metálica monovalente del ácido algínico con un bajo contenido en endotoxinas, tiene múltiples efectos de protección del cartílago frente a la irritación mecánica, de inhibición de los cambios degenerativos en el cartílago causados por el desgaste la inflamación, de reparación de lesiones del cartílago y de supresión de la inflamación y del dolor del tejido articular. Como resultado, la composición de la presente invención es capaz de inhibir la progresión de una condropatía, y de aliviar, mejorar y/o curar los síntomas. Además, la composición para el tratamiento de una condropatía de la presente invención tiene el efecto de mejorar la función articular a través del alivio, la mejora y/o la curación de los síntomas de la misma. La mejora de la función articular se refiere a la mejora del rango de movimiento de la articulación, la mejora del movimiento que se realiza en la vida diaria, y similares.

Cuando se aplica la composición para la regeneración del cartílago de la presente invención en forma de un relleno en un defecto del cartílago, dado que la composición es difícil de aplicar con una jeringa si la viscosidad es elevada, puede usarse una jeringa presurizada o motorizada. En el caso de inyectarla con una jeringa, se usa preferentemente una aguja del calibre 16 a 18G, por ejemplo. En el caso de aplicar la composición para el tratamiento de una condropatía de la presente invención mediante su inyección en una articulación, se usa preferentemente una aguja del calibre 18 a 27G.

La cantidad aplicada de la composición para la regeneración del cartílago de la presente invención se determina dependiendo del tamaño del (los) orificio(s) formado(s) en la lesión del cartílago o el defecto del cartílago en el que se aplica, y aunque no hay ninguna limitación en particular al respecto, en el caso de inyectarla directamente en un defecto del cartílago, por ejemplo, la cantidad aplicada es preferentemente de entre 0,05 y 10 ml, y más preferentemente de entre 0,1 y 2 ml. La aplicación en una lesión del cartílago consiste en la inyección de forma que se rellene adecuadamente el volumen vacío del área afectada. En el caso de aplicar la composición para el tratamiento de una condropatía de la presente invención mediante su inyección en una articulación, la dosis se determina adecuadamente según la cantidad de líquido sinovial de la articulación en la que se va a inyectar la composición, y aunque no hay ninguna limitación en particular al respecto, en el caso de la administración en una articulación de rodilla o un articulación de hombro humana, la dosis es normalmente de entre 1 y 5 ml y más preferentemente de entre 2 y 3 ml. Además, el procedimiento de administración puede consistir, por ejemplo, en la administración de cinco administraciones consecutivas a intervalos de una semana, seguidas por administraciones continuas cada entre 2 y 4 semanas. Aunque no hay ninguna limitación en particular sobre la dosis, la dosis puede ser adecuadamente ajustada según los síntomas y los efectos. Por ejemplo, puede adoptarse un procedimiento de administración en el que la administración se continúa adecuadamente una vez cada dos semanas o una vez al mes. Dado que el ácido algínico no está inherentemente presente en el cuerpo, los animales no tienen ninguna enzima capaz de degradar específicamente del ácido algínico. Aunque normalmente el ácido algínico es descompuesto gradualmente mediante una hidrólisis en el cuerpo de un animal, dado que su descomposición en el cuerpo es baja en comparación con polímeros tales como el ácido hialurónico, pueden esperarse unos efectos

sostenidos a largo plazo en el caso de que sea administrado en una articulación.

La composición para la regeneración del cartílago o el tratamiento de una condropatía de la presente invención contiene como principio activo de la misma una sal metálica monovalente del ácido algínico con un bajo contenido en endotoxinas. Los inventores de la presente invención averiguaron que el propio ácido algínico muestra efectos regenerativos y terapéuticos sobre el tejido del cartílago y el tejido articular en el caso de la administración del ácido algínico en una articulación del cuerpo. El contenido en ácido algínico como principio activo significa que el ácido algínico está contenido en una cantidad que permite que muestre los efectos regenerativos y terapéuticos sobre el tejido del cartílago y el tejido articular cuando se aplica sobre un área afectada, y que la cantidad es preferentemente de al menos el 0,1 % p/v o más de la totalidad de la composición, más preferentemente del 0,5 % p/v o más, y particularmente preferentemente de entre el 1 y el 3 % p/v.

La composición para la regeneración del cartílago o el tratamiento de una condropatía de la presente invención también puede contener los componentes usados habitualmente en productos farmacéuticos, tales como otros principios farmacéuticamente activos y estabilizantes, emulsionantes, ajustadores de la presión osmótica, tampones, agentes isotónicos, conservantes, analgésicos o colorantes usados habitualmente, según sea necesario.

Adicionalmente, en un aspecto de la presente invención, la composición de la presente invención no contiene un componente que muestre una acción farmacológica sobre el cartílago o el tejido articular distinta a la de una sal metálica monovalente del ácido algínico con un bajo contenido en endotoxinas. Una composición que contiene como principio activo de la misma únicamente una sal metálica monovalente del ácido algínico con un bajo contenido en endotoxinas también es capaz de mostrar unos efectos adecuados para la regeneración del cartílago o el tratamiento de una condropatía.

Además, la composición para la regeneración del cartílago o el tratamiento de una condropatía de la presente invención también puede contener un factor que favorezca al crecimiento celular, algunos ejemplos de los cuales incluyen BMP, FGF, VEGF, HGF, TGF- β , IGF-1, PDGF, CDMP, CSF, EPO, IL e IF. Estos factores pueden ser producidos mediante una técnica de recombinación o pueden ser purificados a partir de una composición proteica.

Adicionalmente, en un aspecto de la presente invención, la composición de la presente invención no contiene estos factores de crecimiento. Incluso en el caso de que no contenga ningún factor de crecimiento, sin embargo, la regeneración del cartílago es adecuada, satisfactoria y la seguridad es mayor que en el caso de favorecer agresivamente el crecimiento celular.

9. Procedimiento de tratamiento

Además, la presente invención proporciona un método para el tratamiento de una lesión del cartílago y un método para el tratamiento de una condropatía que usa la composición de regeneración del cartílago o de tratamiento de una condropatía de la presente invención como se ha descrito anteriormente.

"El tratamiento de una lesión del cartílago" o el "tratamiento de una condropatía" es como se ha explicado previamente en la sección 1 titulada "Introducción".

No hay ninguna limitación en particular sobre el procedimiento de aplicación de la composición para la regeneración del cartílago de la presente invención a una lesión del cartílago, y la composición puede ser aplicada, por ejemplo, mediante su inyección directamente en un defecto del cartílago con una jeringa, una pipeta de gel o un relleno especial, y similares, tanto por vía artroscópica como endoscópica. Alternativamente, la composición puede ser inyectada directamente en un defecto del cartílago con una jeringa, una pipeta de gel o un relleno especial, y similares, después de la exposición del área afectada mediante una técnica quirúrgica conocida, tal como una artrotomía utilizando una estrategia pararrotiliana media.

Además, también pueden administrarse fármacos concomitantes que incluyen antibióticos tales como estreptomina, penicilina, tobramicina, amikacina, gentamicina, neomicina o anfotericina B, fármacos antiinflamatorios tales como ácido acetilsalicílico, fármacos antiinflamatorios no esteroideos (AINE) o paracetamol antes, simultáneamente o después de la aplicación de la composición de la presente invención en una lesión del cartílago. Estos fármacos también pueden usarse mezclándolos en la composición de la presente invención.

Además, pueden formarse una o más perforaciones en una lesión del cartílago y la composición de la presente invención puede ser inyectada en la(s) perforación(es) formada(s). Además, la composición también puede usarse de la misma forma mediante la formación de una o más perforaciones en un defecto del cartílago.

Por ejemplo, en el caso de una técnica que implica la exposición de un área afectada mediante un procedimiento quirúrgico, pueden formarse una pluralidad de defectos (defectos de espesor completo) que tienen un diámetro comparativamente menor de, por ejemplo, aproximadamente 1,5 mm, y que se extienden hasta el hueso subcondral utilizando un taladro eléctrico o un cable de acero y similares en un defecto del cartílago en el que hay presente cartílago residual antes de la inyección de la composición de la presente invención, seguido de la inyección de la composición en el mismo. Como resultado de la formación de defectos de espesor completo, se produce una hemorragia desde la médula ósea que permite que las células precursoras del cartílago migren hacia el defecto del

cartilago. La regeneración del cartilago está favorecida por los efectos de las células precursoras del cartilago que han migrado y por la composición de la presente invención, haciendo así posible mejorar la función de la totalidad del cartilago.

5 Alternativamente, pueden formarse defectos parciales que tienen un diámetro comparativamente pequeño de, por ejemplo, aproximadamente 1,5 mm, pero que no se extienden hasta el hueso subcondral, en un defecto del cartilago en el que hay presente cartilago residual, seguido de la aplicación de la composición de la presente invención en el mismo. En el caso de la formación de defectos parciales, no se produce hemorragia de la médula ósea en el defecto y no hay infiltración de células precursoras del cartilago en la médula ósea. Asimismo, en este caso, los efectos de la composición de la presente invención se muestran mediante la aplicación de la composición en los orificios de
10 pequeño diámetro, la regeneración del cartilago es satisfactoria, y puede mejorarse la función de la totalidad del cartilago. Estas técnicas son eficaces en los casos en los que hay presente cartilago residual en el defecto del cartilago.

10. Kit para la regeneración del cartilago del tratamiento de una condropatía

Además, la presente invención proporciona un kit para la regeneración del cartilago o el tratamiento de una
15 condropatía. Este kit incluye la composición para la regeneración del cartilago o el tratamiento de una condropatía de la presente invención como se ha descrito anteriormente, un agente de reticulación, una jeringa, una pipeta de gel, un relleno especial, instrucciones, y similares. Un ejemplo específico preferible de un kit es aquel en el que una sal metálica monovalente del ácido alginico se cierra herméticamente en un compartimento de una jeringa compuesta por dos compartimentos formados íntegramente divididos por una división, y una solución en forma de
20 una solución salina fisiológica o una solución que contiene un agente de reticulación en forma de un ión de calcio tal como CaCl_2 se cierra herméticamente en el otro compartimento, y está compuesta de tal forma que la división entre los compartimentos puede ser penetrada fácilmente en el momento de su uso para permitir que el contenido de ambos compartimentos se use mediante la mezcla y la disolución en el momento de su uso. Otro ejemplo de un kit es el de una solución de una sal metálica monovalente del ácido alginico que se cierra herméticamente en una
25 jeringa precargada que permite su administración directamente en el momento de su uso sin la necesidad de un procedimiento de preparación. Otro ejemplo es un kit en el que hay precintadas una solución de ácido alginico y un agente de reticulación en jeringas individuales y envasadas conjuntamente en un único envase. La "composición para la regeneración del cartilago o el tratamiento de una condropatía", el "agente de reticulación" y la "jeringa" son como se ha explicado previamente. Adicionalmente, puede haber células incorporadas en la composición que contiene una sal metálica monovalente del ácido alginico como se ha descrito previamente. Además, el kit también puede contener fármacos concomitantes que incluyen antibióticos tales como estreptomina, penicilina, tobramicina, amikacina, gentamicina, neomicina o anfotericina B, o fármacos antiinflamatorios tales como ácido acetilsalicílico, fármacos antiinflamatorios no esteroideos (AINE) o paracetamol.

El uso de este kit permite llevar a cabo uniformemente la terapia regenerativa del cartilago y la terapia de la
35 condropatía.

Se hace referencia a las memorias descriptivas de la Solicitud de Patente Japonesa nº 2007-41520 y la Solicitud de Patente Japonesa nº 2007-277005, que sirven como base para la reivindicación de prioridad de la presente solicitud.

Lo siguiente proporciona una explicación detallada de la presente invención a través de ejemplos de la misma. Los ejemplos no cubiertos por el ámbito de las reivindicaciones son con fines ilustrativos.

40 **Ejemplo 1**

Preparación de la solución de alginato de sodio

En el presente ejemplo se usaron dos tipos de alginato de sodio que consisten en un alginato de sodio purificado (Kimica Corp., Mochida International Ltd., Sea Matrix (esterilizado), nº de serie B5Y01) y alginato de sodio no purificado de calidad alimentaria (denominado también alginato de sodio de calidad comercial, Wako Pure Chemical Industries, Ltd., Sodium Alginate 500, 199-09961). El alginato de sodio purificado fue esterilizado y liofilizado. El alginato de sodio de calidad alimentaria fue esterilizado mediante una filtración con un filtro que tiene un diámetro de poro de 0,22 μm .
45

Cuando se midieron los niveles de endotoxinas utilizando un kit de ensayo de LAL disponible comercialmente (Limulus Color KY Test Wako, Wako, Japón), el nivel de endotoxinas del alginato de sodio purificado era de 5,76 EU (unidades de endotoxinas)/g, y el del alginato de sodio de calidad alimentaria era de 75.950 UE/g, indicando por lo tanto que el nivel de endotoxinas del alginato de sodio purificado era bastante menor que el del alginato de sodio de calidad alimentaria. A saber, el alginato de sodio purificado había sido sometido a un tratamiento de reducción de las endotoxinas. Además, el contenido en metales pesados del alginato de sodio purificado era de 20 ppm o menos, el contenido sulfato de plomo era del 0,98 % o menos, y el contenido en arsénico era de 2 ppm o menos.
50

Además, se prepararon soluciones de alginato de sodio a unas concentraciones del 1 % p/v y del 2 % p/v a partir de cada alginato de sodio utilizando agua Milli-Q esterilizada por filtración. A continuación se midió la viscosidad de cada concentración de la solución de alginato de sodio a 20 °C utilizando un viscosímetro rotacional (de tipo de cono
55

y placa, TVE-20LT, Toki Sangyo Co., Ltd., Japón). Las velocidades de rotación eran de 1 rpm cuando se medían las soluciones de alginato de sodio al 1 %, y de 0,5 rpm cuando se medían las soluciones de alginato de sodio al 2 %, y los intervalos de medición consistían en M cuando se medían las soluciones de alginato de sodio al 1 %, y de 5 M cuando se medían las soluciones de alginato de sodio al 2 %. Los resultados se muestran en la Tabla 1.

5 (Tabla 1)

Ácido algínico	Concentración (%)	Viscosidad (mPa • s)				
		1ª medición	2ª medición	3ª medición	Promedio	Desviación típica
De calidad alimentaria	1	533,5	537,0	531,5	534,0	2,27
De calidad alimentaria	2	5.377,0	5.336,0	5.325,0	5.346,0	22,38
Purificado	1	435,4	434,1	429,3	432,9	2,62
Purificado	2	5.359,0	5.496,0	5.488,0	5.447,7	62,78

10 Como se muestra en la Tabla 1, la viscosidad del alginato de sodio purificado era de aproximadamente 430 mPa • s para la solución al 1 % p/v, y de aproximadamente 5.400 mPa • s para la solución al 2 % p/v. La viscosidad del alginato de sodio purificado de calidad alimentaria era de aproximadamente 530 mPa • s para la solución al 1 % p/v, y de aproximadamente 5.300 mPa • s para la solución al 2 % p/v. Sobre la base de los resultados para ambos grupos, se encontró que la viscosidad de cada solución de alginato de sodio purificado y de alginato de sodio purificado de calidad alimentaria usadas en el presente ejemplo era de entre aproximadamente 400 y 600 mPa • s a una concentración del 1 % p/v, y de entre aproximadamente 5.000 y 6.000 mPa • s a una concentración del 2 % p/v.

15 Se confirmaron las propiedades físicas para las soluciones de alginato de sodio purificado y de alginato de sodio de calidad alimentaria que tienen unas concentraciones del 1, el 2 o el 3 % p/v. Cuando se aplicaron varias gotas de cada concentración de las soluciones de alginato de sodio desde abajo en una placa de plástico invertida, a pesar de que la mayoría de las soluciones de alginato de sodio al 1 % p/v (viscosidad: de entre aprox. 400 y 600 mPa • s) caían de la placa en unos pocos segundos debido a la gravedad, parte del alginato de sodio quedaba adherido en el fondo de la placa. Sobre la base de este resultado, si una composición que contiene una sal metálica monovalente del ácido algínico tiene una viscosidad de entre aproximadamente 400 y 600 mPa • s o más, se sugirió que podían obtenerse los efectos de la presente invención, dado que la composición tenía adhesividad y la propiedad de permanecer en el área afectada. Por el contrario, las soluciones de alginato de sodio que tienen una concentración del 2 % p/v (viscosidad: de entre aprox. 5.000 y 6.000 mPa • s) no se cayeron de la placa y permanecieron adheridas a la placa durante al menos aproximadamente un minuto. Incluso después de que algunas de las soluciones hubieran caído desde la placa, quedaba una gran cantidad de alginato de sodio adherida a la misma. Las soluciones de alginato de sodio que tienen una concentración del 3 % p/v permanecieron adheridas a la placa incluso más tiempo que las soluciones al 2 % p/v.

25 Por otro lado, con respecto a la facilidad de manipulación de la composición, las soluciones de alginato de sodio al 3 % p/v necesitaron algún tiempo para disolverse en el agua Milli-Q y aunque fueron un poco difíciles de introducir en la pipeta y en la jeringa, la pipeta y la jeringa pudieron ser manipuladas. Las soluciones de alginato de sodio al 1 % y al 2 % p/v eran fáciles de manipular.

30 Aquí, dado que se pensaba que el alginato de sodio usado aquí era similar a la solución de alginato de sodio que tiene una concentración del 1 % y una viscosidad de 570 mPa • s usada en el Experimento 10, se determinó que la viscosidad de las soluciones de alginato de sodio al 3 % p/v era de aproximadamente 20.000 mPa • s. Por lo tanto, se sugirió que la viscosidad de la composición que contiene una sal metálica monovalente del ácido algínico era preferentemente de aproximadamente 20.000 mPa • s o menos con respecto a la facilidad de manipulación cuando se utiliza una pipeta o una jeringa.

35 Sobre la base los resultados anteriores, cuando se hacía que la viscosidad de las soluciones de alginato de sodio fuera de entre 5.000 y 6.000 mPa • s, la preparación y la manipulación eran más fáciles y se indicó que esta viscosidad era adecuada para su uso como una composición para la regeneración del cartílago o el tratamiento de una condropatía. En el entorno clínico, hay muchos casos en los que la lesión del cartílago está orientada hacia abajo o un lateral, tal como en el caso de la manipulación artroscópica de una lesión del cartílago en la superficie de la articulación femoral, por ejemplo. Como resultado del ajuste de la viscosidad de la composición de la presente invención, se indicó que la composición era susceptible de ser usada en una amplia variedad de diversas formas de lesiones del cartílago, incluso con respecto a lesiones del cartílago que implican un procedimiento difícil de esta forma. Adicionalmente, la concentración puede ser ajustada hasta aproximadamente un 2 % p/v utilizando agua Milli-Q con objeto de obtener una viscosidad de entre 5.000 y 6.000 mPa • s en el caso de la solución de alginato de sodio purificado usada en el presente ejemplo.

Ejemplo 2

Producción de células para trasplante

Se aislaron células estromales mesenquimatosas de médula ósea (BMSC) y se cultivaron para obtener células para trasplante. Las BMSC incluyen células eritropoyéticas y similares, además de las células madre mesenquimatosas de médula ósea. Se recogieron 10 ml de médula ósea a partir de la tibia de ratones blancos japoneses de cuatro meses de edad, seguido de un lavado dos veces con PBS exento de Ca y Mg (Gibco BRL Lab.) y se suspendieron en DMEM con un alto contenido en glucosa (DMED-HG, Sigma Chemical, St. Louis, MO). Los coágulos sanguíneos se eliminaron con un colador celular que tiene un diámetro de poro de 70 µm (Falcon Co., Ltd.). Después, las células se incubaron con humidificación a 37 °C y un 5 % de CO₂ en una placa de cultivo de 100 mm que contiene un medio de cultivo que consiste en DMEM-HG, suero bovino fetal al 10 % (FBS, Gibco, Life Technology, Grand Island, NY) y un 1 % de antibióticos (penicilina-estreptomicina-fungizona 100X concentrado, Cambrex Biosciences, Walkersville, MD). El medio de cultivo fue sustituido cada tres días y se eliminaron las células no adherentes. Después de cultivar la monocapa de células adherentes durante entre 10 y 14 días, las células se eliminaron con tripsina-EDTA (10 mM, Sigma, Reino Unido) y se contaron, seguido de un subcultivo cada tres días.

Ejemplo 3

Producción de microesferas de alginato

Las células obtenidas en el Ejemplo 2 se suspendieron a 2,5 x 10⁷ células/ml en una solución de alginato de sodio ajustada a una concentración del 2 % p/v con agua Milli-Q esterilizada por filtración. La suspensión se gelificó goteando una solución de CaCl₂ con una pipeta, y después lavando dos veces las microcápsulas que se formaron 10 minutos después con PBS exento de Ca y Mg, las microcápsulas se lavaron una vez con DMED-HG. Las microesferas resultantes contenían 1 x 10⁶ células por 40 µl por microesfera.

Las células fueron recogidas a partir de las microesferas de alginato lavando tres veces con PBS e incubando a 37 °C y un 5 % de CO₂ en EDTA 50 mM (Gibco BRL Laboratories) seguido de una centrifugación durante 5 minutos a 1.500 g 10 minutos después, para recoger las células.

Ejemplo 4

Toxicidad por calcio en las células en el procedimiento con microesferas de alginato

Se midió la tasa de supervivencia de las células encapsuladas en ácido algínico goteando una solución de CaCl₂ utilizando el kit de recuento celular 8 (CCK-8, Dojindo Laboratories, Tokio, Japón). Las células obtenidas en el Ejemplo 2 se suspendieron a 2,5 x 10⁷ células/ml en una solución de alginato de sodio ajustada a una concentración del 2 % p/v y dejaron gotear a unas concentraciones de 50, 100, 200 y 400 mM de la solución de CaCl₂ según el procedimiento del Ejemplo 3 y se sumergieron durante 15 minutos para obtener microesferas que contienen 1 x 10⁶ células por 40 µl por microesfera. Después de lavar las microesferas de alginato dos veces con PBS, se recogieron las células de las microesferas utilizando el procedimiento descrito en el Ejemplo 3 y después se suspendieron en DMED-HG. Se sembraron las células de cada grupo en una placa de 96 pocillos y se incubaron durante 1 hora, seguido de la adición de 20 µl de una solución de CCK-8 a cada pocillo e incubando durante 4 horas adicionales. Se obtuvieron las tasas de supervivencia de las células midiendo la absorbancia a 450 nm utilizando un lector de microplacas (Bio-Rad Japan Life Science Research, Tokio, Japón).

Resultados

Las tasas de supervivencia de las células en cada concentración de la solución de CaCl₂ se muestran en la FIG. 1.

Las tasas de supervivencia de las células en las microesferas de alginato disminuyeron de una forma dependiente de la concentración de calcio, y disminuyeron significativamente partiendo de una concentración de 200 mM. Por lo tanto, se demostró que el CaCl₂ presentaba citotoxicidad. Además, se averiguó que era apropiado elaborar la concentración de cloruro de calcio que entra en contacto con el alginato de sodio para que fuera de aproximadamente 100 mM, para minimizar los efectos sobre las células y permitir la gelificación del alginato de sodio tan rápida y firmemente como fuera posible.

Ejemplo 5

Comparación de las tasas de supervivencia de las células en el procedimiento con microesferas de alginato

Se compararon las tasas de supervivencia de las células en microesferas de alginato para el alginato de sodio purificado sometido a un tratamiento de reducción de las endotoxinas y el alginato de sodio purificado de calidad alimentaria no sometido a un tratamiento de reducción de las endotoxinas. Cada una de las microesferas de alginato fue producida suspendiendo las células obtenidas en el Ejemplo 2 en una solución de alginato de sodio al 2 % p/v según el procedimiento del Ejemplo 3, seguido de un goteo en la solución de CaCl₂ 100 mM. Cada microesfera se formó para que contuviera 1 x 10⁶ células por 40 µl por microesfera. Se cultivaron los dos tipos de cápsulas de ácido algínico durante 0, 1, 2, 3, 7 o 14 días en DMED-HG que contiene un 10 % de FBS y un 1 % de antibiótico. Se

recogieron las células de cada cápsula según el procedimiento descrito en el Ejemplo 3, y se contó el número de células viables utilizando el kit CCK-8.

Resultados

5 Los resultados se muestran en la FIG. 2. El número de células viables restante era significativamente mayor cuando se utilizaba la solución de alginato de sodio purificado sometida al tratamiento de reducción de las endotoxinas en comparación con el uso de la solución de alginato de sodio purificado de calidad alimentaria no sometida al tratamiento de reducción de las endotoxinas los días 1, 3 y 7. Se confirmó que la solución de alginato de sodio sometida al tratamiento de reducción de las endotoxinas ofrecía la ventaja, por ejemplo, de tener una menor toxicidad sobre las células tempranamente en el procedimiento (en 7 días), en particular en comparación con la que no ha experimentado el tratamiento de reducción de las endotoxinas.

Ejemplo 6

Cultivo *in vitro* en microesferas de alginato

Procedimiento

(Cultivo)

15 Se produjeron microesferas que contienen 1×10^6 células por 40 μ l por microesfera similares a las del Ejemplo 5 según el Ejemplo 3 para el alginato de sodio purificado y el alginato de sodio purificado de calidad alimentaria, respectivamente. Se colocaron microesferas individuales en cada pocillo de placas de cultivo de 24 pocillos, y se cultivaron en 1 ml del medio de cultivo estándar descrito a continuación. A saber, el medio de cultivo estándar usado consistía en DMEM-HG que contiene 100 μ g/ml de piruvato de sodio (ICN Biochemicals, Aurora, OH), 40 μ g/ml de prolina (ICN Biochemicals, Aurora, OH), 50 μ g/ml de 2-fosfato de ácido ascórbico (Wako, Osaka, Japón), dexametasona 1×10^{-7} M (ICN Biochemicals, Aurora, OH), ITS Plus Mix al 1 % (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO), un 1 % de antibióticos y 10 ng/ml de factor de crecimiento transformante humano recombinante β 3 (R&D System, Minneapolis, MN) disuelto en HCl 4 mM que contiene 1 mg/ml de albúmina sérica bovina. Las placas de cultivo se incubaron a 37 °C y el medio fue sustituido cada tres días.

25 (Análisis del ARN mediante una RT-PCR en tiempo real)

Después de cultivar durante 14 días, se eliminó el ARN total de las células homogeneizadas y se analizó la expresión génica del colágeno de tipo I, II y X, aggrecan y Sox 9. Todos los experimentos se llevaron a cabo mediante los procedimientos convencionales.

30 A saber, el rendimiento de ARN se determinó midiendo las absorbancias a 260 y a 280 nm. Después se sintetizó ADNc a partir de 0,05 μ g de ARN utilizando el sistema de transcripción inversa ImProm-II™ (Promega, Madison, WI) según el manual. En ese momento, el producto de unión del ARN total y un cebador aleatorio fue desnaturalizado durante 5 minutos a 70 °C seguido inmediatamente por un enfriamiento durante 5 minutos en agua enfriada con hielo y llevando a cabo la transcripción inversa durante 60 minutos a 42 °C utilizando la transcriptasa inversa ImProm-II™. Después se diluyó el ADNc resultante con agua de calidad PCR (Roche Diagnostics, Indianapolis, IN) para ajustar la concentración hasta menos de 40 ng/ μ l. Después se llevó a cabo la PCR con un volumen de reacción de 20 μ l y se monitorizó utilizando el sistema de detección por fluorescencia continua de ADN Engine Opticon™ 2 (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA).

Las señales fueron detectadas con el kit SYBR Green qPCR (Finzyme, Espoo, Finlandia) utilizando cebadores génicos específicos diseñados por ADNSIS (Hitachi Software Engineering, Tokio, Japón).

40 Más específicamente, los cebadores utilizados son según se indican a continuación.

Colágeno de tipo I de conejo: (5'-3') TAAGAGCTCCAAGGCCAAGA (SEQ ID NO. 1) y (3'-5') TGTACCTACTCCTTGACCG (SEQ ID NO. 2)

Colágeno de tipo II de conejo: (5'-3') AGAGACCTGAACTGGGCAGA (SEQ ID NO. 3) y (3'-5') ACCACGATATGAGGCACAGTTT (SEQ ID NO. 4)

45 Colágeno de tipo X de conejo: (5'-3') GCCAGGACCTCCAGGACTAT (SEQ ID NO. 5) y (3'-5') CTTTGGACCTGTTGTCCT (SEQ ID NO. 6)

Aggrecan de conejo: (5'-3') GAGGTCGTGGTGAAGGTGT (SEQ ID NO. 7) y (3'-5') TGACAGTCCATGGGGTAGGT (SEQ ID NO. 8)

50 Sox 9 de conejo: (5'-3') AAGGGCTACGACTGGACGCT (SEQ ID NO. 9) y (3'-5') GTGCAGTTCGCCGGGT (SEQ ID NO. 10)

Después de una etapa inicial de desnaturalización durante 10 minutos a 95 °C, los productos del ADNc fueron amplificados mediante 40 ciclos de una PCR. Cada ciclo consistía en una etapa de desnaturalización durante 10 segundos a 94 °C, una etapa de hibridación durante 20 segundos a 58 °C y una etapa de elongación durante 30 segundos a 72 °C. Los datos fueron analizados utilizando el programa informático Opticon Monitor™ (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA). Se determinó el valor obtenido para cada muestra cuando la intensidad de la

fluorescencia alcanzó 0,03 como el valor Ct (umbral del ciclo). Este valor fue seleccionado confirmando que todas las curvas estaban en la fase de amplificación exponencial en este intervalo. El nivel de expresión relativo de cada gen se calculó utilizando el procedimiento comparativo modificado del Ct a partir de los valores del Ct de cada gen objetivo y el gen de referencia (GAPDH).

5 (Tinción)

Las microesferas se lavaron con PBS después de un cultivo de 21 y de 28 días, y después de fijarlas durante 24 horas con paraformaldehído tamponado con fosfato al 10 %, las microesferas se incluyeron en parafina. Las microesferas se cortaron en secciones de 5 µm desde el centro de las microesferas, seguido de la realización de una tinción con H-E y una tinción con Safranina-O según los procedimientos habituales. Además, se confirmó la formación de colágeno de los tipos I, II y X con anticuerpos anti-colágeno anti-tipo I, anti-tipo II (Fuji Pharm. Lab., Toyama, Japón) y anti-tipo X (Sigma, St. Louis, MO).

Resultados

Los resultados del análisis del ARN mediante una RT-PCR en tiempo real se muestran en la FIG. 3. Además, los resultados de la tinción se muestran en la FIG. 4. La FIG. 4A y la FIG. 4B muestran los resultados de la utilización del alginato de sodio purificado, mientras que la FIG. 4C y la FIG. 4D muestra los resultados de la utilización del alginato de sodio purificado de calidad alimentaria. Además, la FIG. 4A y la FIG. 4C muestran los resultados del cultivo durante 21 días, mientras que la FIG. 4B y la FIG. 4D muestran los resultados del cultivo durante 28 días. Además, las FIG. 4A hasta FIG. 4D muestran, respectivamente, de izquierda a derecha, los resultados de una tinción con H-E, de una tinción con Safranina, y de los anticuerpos anti-colágeno anti-tipo I, anti-tipo II y anti-tipo X.

Con respecto a los resultados de la RT-PCR (FIG. 3), se observaron aumentos en el colágeno de tipo II, aggrecan y Sox 9, lo que indica la diferenciación de las células en el cartílago, cuando se utiliza tanto el alginato de sodio purificado como el alginato de sodio purificado de calidad alimentaria. Una comparación entre los dos tipos reveló que el cultivo con el alginato de sodio purificado produjo unos niveles significativamente mayores de aggrecan y de Sox 9.

Además, con respecto a los resultados de la tinción (FIG. 4), se produjo una matriz extracelular que se tiñó con Safranina-O y una inmunotinción del colágeno de tipo II, lo que indica una diferenciación del cartílago, para ambos tipos de microesferas de alginato, y se observó una diferenciación del cartílago.

Ejemplo 7

Modelo de conejo de reparación de cartílago

30 Procedimiento

(Procedimiento)

Se anestesiaron cuarenta conejos blancos japoneses hembra (peso corporal: desde 2,6 hasta 2,9 kg) con isoflurano en O₂ gaseoso y una inyección intravenosa de pentobarbital (0,05 mg/kg) seguida de una inyección intramuscular de antibiótico (Penicilina G, Meiji-Seika, Japón) y un rasurado de las patas. Se realizó una incisión anteromedial de 2 cm en la piel y se accedió al surco troclear utilizando una estrategia parrotuliana media. Se crearon defectos osteocondrales (diámetro: 5 mm, profundidad: 2 mm) en la tróclea femoral utilizando un taladro eléctrico (Rexon, Japón). Después se irrigaron las rodillas con solución salina fisiológica, se confirmó la ausencia de hemorragia en los defectos y los defectos se dejaron secar.

En el presente ejemplo, el experimento se lleva a cabo dividiendo los animales en cinco grupos.

- 40
- A) Grupo de control (vacío)
 - B) Grupo con el alginato de calidad alimentaria (sin células)
 - C) Grupo con el alginato de calidad alimentaria + células (2,5 x 10⁷/ml)
 - D) Grupo con el alginato purificado (sin células)
 - E) Grupo con el alginato purificado + células (2,5 x 10⁷/ml)

45 Los defectos se dejaron sin tratar en el grupo de control A). Además, se aplicó una solución de alginato de sodio purificado de calidad alimentaria al 2 % p/v a los defectos en el grupo con el alginato de calidad alimentaria B) (sin células). Se aplicó una solución de alginato de sodio purificado el 2 % p/v a los defectos en el grupo con el alginato purificado D) (sin células). Además, las células obtenidas en el Ejemplo 2 se suspendieron en una solución de alginato de sodio purificado de calidad alimentaria al 2 % p/v o una solución de alginato de sodio purificado al 2 % p/v y se aplicaron a los defectos en el cartílago articular en el grupo con el alginato de calidad alimentaria + células C) y en el grupo con el alginato purificado + células E), respectivamente. Se usaron células autólogas de conejo preparadas según el procedimiento descrito en el Ejemplo 2 para las células en esta ocasión.

La razón de hacer que la concentración de las soluciones de alginato de sodio sea del 2 % p/v es que la viscosidad puede ajustarse a un nivel de entre 5.000 y 6.000 mPa • s, adecuada para el procedimiento basado en los resultados

del Ejemplo 1.

Los conejos fueron inmovilizados con los defectos orientados hacia arriba, y se aplicó la composición de la presente invención a los defectos utilizando una pipeta de gel.

5 Dado que la viscosidad de la solución de alginato de sodio era adecuada en los grupos B) hasta E), las soluciones de alginato de sodio no fluían fuera de los defectos a pesar de que las condiciones facilitaban el flujo debido al líquido sinovial. Posteriormente, se aplicaron aproximadamente 0,5 ml de una solución de CaCl_2 100 mM lentamente y de forma continua a lo largo del transcurso de 10 segundos en la superficie del injerto utilizando una jeringa de calibre 27G. La capa superficial del injerto gelificó inmediatamente, y las células no abandonaron el área afectada. La solución de CaCl_2 se lavó con solución salina fisiológica. No fue necesaria ninguna inmovilización adicional, y el área afectada se suturó después del procedimiento. Los conejos pudieron moverse libremente.

10 Los conejos en cuestión fueron sacrificados mediante una inyección intravenosa de una dosis excesiva de pentobarbital a las 4 semanas o a las 12 semanas después del procedimiento. Se extirparon los extremos distales del fémur con una sierra mecánica. La FIG. 5 muestra las fotografías tomadas en el momento del procedimiento.

(Observaciones globales)

15 Se observó el aspecto global macroscópico y se puntuó. El aspecto global se puntuó según los criterios de la FIG. 6 con referencia al procedimiento de Gabriele, G. et al. (Biomaterial, 21 (2000), 2561-2574).

(Tinción)

20 Posteriormente, las muestras se fijaron con paraformaldehído, se descalcificaron y se incluyeron en parafina. Se tiñeron secciones ubicadas a 5 μm del centro del defecto con Safranina-O, una tinción con H-E y se inmunotizaron con anti-colágeno de tipo I y anti-colágeno de tipo II. Se usó el sistema de puntuación descrito en la FIG. 7 para la evaluación del tejido cartilaginoso recién formado, y el tejido fue evaluado microscópicamente. La puntuación fue realizada por observadores independientes con enmascaramiento.

(Medición de la resistencia mecánica)

25 La resistencia mecánica del área afectada se midió utilizando un ensayo de indentación. Las muestras se fijaron firmemente con la articulación femorrotuliana orientada hacia arriba, y el ensayo se llevó a cabo a la temperatura ambiente. El indentador se movió automáticamente hacia el centro del cartílago regenerado y se registró el desplazamiento (mm) relativo a la carga (N). Se midió el espesor del tejido regenerado a partir de las secciones histológicas. Después se obtuvo el módulo de Young a partir de la región lineal de las curvas de carga-desplazamiento.

30 Resultados

Los resultados de la tinción se muestran en la FIG. 8 hasta la FIG. 11.

35 Como resultado de la tinción con H-E, de la tinción con Safranina-O y de la inmunotinción con anti-colágeno de tipo II, se confirmó la formación más prominente de cartílago hialino y de colágeno de tipo II en comparación con los otros grupos en el grupo con el alginato purificado + células E) (FIG. 11) en una fase temprana, 4 semanas después del procedimiento. Se observó que se había regenerado aproximadamente un 80 % del cartílago a las 12 semanas después del procedimiento. La formación de hueso subcondral era extremadamente favorable basándonos en los resultados de la tinción con H-E. La tinción con Safranina-O reveló la formación de proteoglicano, y también pudo confirmarse la formación de una matriz extracelular. Por otro lado, apenas había formación alguna de cartílago fibroso observada basándonos en los resultados de la tinción con H-E y de la inmunotinción con anti-colágeno de tipo I.

40 El grupo con alginato purificado (sin células) D) (FIG. 10) mostró una formación favorable de cartílago hialino, de colágeno de tipo II y de hueso subcondral en comparación con el grupo con el alginato de calidad alimentaria + células C) (FIG. 9). En el grupo D), en el que no había células incorporadas, sorprendentemente se encontró que se había obtenido una regeneración del cartílago por parte de los condrocitos hialinos. Además, también se encontró inesperadamente que el grupo D), en el que no había células incorporadas, mostró una capacidad superior para regenerar la lesión del cartílago en comparación con el grupo C), en el que había células incorporadas.

Por otro lado, apenas había ninguna neogénesis del cartílago y del colágeno de tipo II observada en el grupo de control A) (FIG. 8) en el que los defectos se dejaron sin tratar.

50 Los resultados de la evaluación obtenidos mediante la puntuación macroscópica del aspecto global (Macro) y los resultados de la evaluación obtenidos mediante la puntuación de las observaciones basadas en la tinción descrita anteriormente (Histológica) se muestran en la FIG. 12.

Las puntuaciones totales obtenidas mediante la combinación de las puntuaciones Macro e Histológica en la semana 12 consistieron en 22,71 para el grupo con el alginato purificado + células E), 19,57 para el grupo con el alginato

5 purificado (sin células D), 14,75 para el grupo con el alginato de calidad alimentaria + células C), 10,25 para el grupo con el alginato de calidad alimentaria (sin células) grupo B), y 8,43 para el grupo de control A) (vacío). Por lo tanto, el grupo con el alginato purificado + células E) mostró la mayor puntuación, seguido del grupo con el alginato purificado (sin células) D) y el grupo con el alginato de calidad alimentaria + células C) por ese orden. Era completamente inesperado que el grupo D), en el que no había células incorporadas, produjera una puntuación total mayor, y demostrara así la capacidad superior para regenerar el cartílago en lesiones del cartílago, en comparación con el grupo C), en el que había células incorporadas.

10 Los resultados de la puntuación tanto para la evaluación macroscópica del aspecto global (Macro total) como para la evaluación mediante una tinción (Histológica total) eran los más altos en el grupo con el alginato purificado + células E), de la misma forma a la que se ha descrito anteriormente, y la siguiente puntuación más alta se observó en el grupo con alginato purificado (sin células) D).

15 Al observar los parámetros de evaluación Macro, los grupos D) y E), en los que se usó alginato purificado, eran superiores en todos los parámetros de interacción del borde (tejido nuevo con respecto al cartílago natural), la suavidad de la superficie del cartílago, la superficie del cartílago, el grado de relleno y el color del cartílago, la opacidad o la translucencia del neocartílago en comparación con los grupos B) y C) en los que se usó alginato de calidad alimentaria.

20 Al observar los parámetros de evaluación Histológica, los grupos D) y E), en los que se usó alginato purificado, mostraron unas puntuaciones mayores que los grupos B) y C), en los que se usó alginato de calidad alimentaria, para los parámetros de naturaleza del tejido predominante, regularidad de la superficie, integridad y homogeneidad estructural, espesor, adhesión al cartílago adyacente, cambios degenerativos en el cartílago adyacente y respuesta inflamatoria.

25 Sobre la base de estos hallazgos, la composición de la presente invención representada por los grupos D) y E) mostró una formación extremadamente favorable de condrocitos y de tejido del cartílago en una lesión del cartílago, incluyendo la formación de cartílago hialino, de colágeno de tipo II y de hueso subcondral. Apenas se produjo formación de cartílago fibroso observada.

La unión del tejido regenerado al tejido del hospedador también era favorable, había poca degeneración o inflamación en el cartílago adyacente, y se determinó que la bioafinidad era elevada.

Por lo tanto, se confirmó que la composición de la presente invención favorecía eficazmente la regeneración del cartílago en lesión del cartílago.

30 Los resultados de la medición de la resistencia mecánica para los grupos con alginato purificado D) y E) se muestran en la FIG. 13.

35 Como resultado de la medición de la resistencia mecánica para los grupos con alginato purificado, la resistencia mecánica en el grupo con el alginato purificado + células E) tenía un módulo de Young de 8 frente a un módulo de Young de 10 en el tejido normal del cartílago, indicando así que se había recuperado la resistencia hasta un estado prácticamente normal exento de lesiones. Este hallazgo también apoyaba la reivindicación de que la composición de la presente invención con células incorporadas tenía una resistencia mecánica superior, y es favorable con respecto a la regeneración de un fuerte cartílago hialino y la formación de hueso subcondral.

Ejemplo 8

Modelo de cadáver masculino que ha experimentado un procedimiento de tratamiento apropiado

40 Se fijó un cadáver humano masculino que ha experimentado un tratamiento apropiado con formalina. No había ninguna inestabilidad ni deformidad en la rodilla a la temperatura ambiente. El cóndilo lateral del fémur se expuso utilizando una estrategia pararrotiliana media. El cartílago articular era liso y no había ninguna degeneración ni deterioro observados. Se produjo un defecto del cartílago de espesor completo que medía 10 mm x 20 mm de ancho y 5 mm de profundidad en la sección portadora del máximo peso del cóndilo medio utilizando varios tipos de
45 punzones, y después se suturó. Se insertó un artroscopio a un ángulo de 30° desde el lado anterolateral. Todos los instrumentos quirúrgicos se insertaron desde el lado anterolateral. Después de la aplicación de solución salina fisiológica en el área afectada, se drenó el resto del líquido de la articulación seguido de una limpieza con un hisopo de algodón seco. Se inyectó lentamente una solución de alginato de sodio purificado al 2 % p/v (sin células) coloreada con trypan blue y que tiene una viscosidad de entre 5.000 y 6.000 mPa • s en el defecto del cartílago con
50 una jeringa de un calibre 18G. Aunque el área afectada estaba orientada hacia abajo en el momento del procedimiento, la composición de la presente invención no se salió de la lesión y permaneció en la misma. Se aplicaron 10 ml de una solución de CaCl₂ 100 mM en el área afectada para gelificar la superficie. La articulación de la rodilla se lavó adecuadamente a reflujo con solución salina fisiológica, y el área afectada se llenó con 20 ml de solución salina fisiológica para impedir que se secase.

55 Después del procedimiento, la rodilla se extendió manualmente y se flexionó a lo largo de un intervalo de entre 0 y 120° 200 veces cada vez a intervalos de seis horas. El área afectada fue evaluada 24 horas después del

procedimiento.

Resultados

5 Las fotografías que representan este experimento se muestran en la FIG. 14. La FIG. 14A es una fotografía que muestra la creación del defecto del cartílago. Además, la FIG. 14B muestra la solución coloreada de alginato de sodio trasplantada en el defecto del cartílago. La FIG. 14C muestra la superficie del alginato de sodio siendo gelificada (curada) mediante la aplicación de una solución de CaCl_2 . Finalmente, la FIG. 14D muestra los resultados de la observación del movimiento de la articulación 24 horas después de la cirugía.

Este experimento se llevó a cabo para confirmar si la composición de la presente invención podía ser trasplantada en el caso de que se haya creado un gran defecto no sólo en conejos, sino también en un cadáver humano.

10 Como se muestra en la fotografía de la FIG. 14B, la solución de alginato de sodio no se salió del área afectada incluso si la superficie de la solución de alginato de sodio no había gelificado después de su inyección en el defecto. Además, la solución de alginato de sodio permaneció en el defecto incluso después de que la articulación se hubiera movido después de la cirugía y observado 24 horas después posteriores a la gelificación de la superficie de la solución de alginato de sodio. Fue sorprendente averiguar que una composición de esta forma es capaz de permanecer en el defecto en una zona sometida a unas condiciones duras que consisten en la aplicación de una carga y un movimiento violento. Sobre la base de este hallazgo, se determinó que la composición para la regeneración del cartílago o el tratamiento de una condropatía de la presente invención tenía unas propiedades físicas que le permitían ser aplicado en una amplia variedad de aplicaciones clínicas con respecto a diversas formas de lesiones de cartílago y de condiciones de uso.

20 **Ejemplo 9**

Técnica para la formación de entre una y múltiples pequeñas perforaciones en una lesión del cartílago

(1) Primer ejemplo

25 En los casos en los que sigue quedando cartílago en la lesión del cartílago o en un defecto del cartílago, se producen entre uno y múltiples defectos de espesor completo con un diámetro comparativamente pequeño que tienen un diámetro de aproximadamente 1,5 mm y una profundidad de entre aproximadamente 5 y 10 mm y que se extienden hasta el hueso subcondral en una lesión del cartílago o un cartílago residual utilizando un taladro eléctrico según el método de los Ejemplos 7 y 8. Después de inyectar lentamente en los mismos una solución de alginato de sodio purificado (sin células) que tiene una viscosidad de entre 3.000 y 4.000 mPa • s con un agujero del calibre 18G, se aplica 1,0 ml de una solución de CaCl_2 100 mM en la superficie de la solución de alginato de sodio inyectada en el defecto para gelificar la superficie del mismo. Como resultado de producir el (los) defecto(s) de espesor completo, se produce una hemorragia desde la médula ósea del paciente que permite que las células precursoras del cartílago de la médula ósea migren hasta el defecto del cartílago. La regeneración del cartílago es favorecida por los efectos de las células precursoras del cartílago que han migrado, y por la composición de la presente invención, haciendo que sea posible mejorar la función de la totalidad del cartílago.

35 (2) Segundo ejemplo

40 Se produce un defecto parcial que no se extiende hasta el hueso subcondral en una lesión del cartílago o en un defecto del cartílago en el que hay presente cartílago residual de una forma similar a la del primer ejemplo descrito anteriormente ejemplo. Después se aplica una solución de alginato de sodio purificado (sin células) que tiene una viscosidad de entre 2.000 y 3.000 mPa • s y una solución de CaCl_2 100 mM de la misma forma que en el primer ejemplo. Dado que no hay ninguna hemorragia en el defecto procedente de la médula ósea del paciente, no hay ninguna infiltración de células precursoras del cartílago en la médula ósea del sujeto. Sin embargo, en este caso también, como resultado de la aplicación de la composición en los orificios de pequeño diámetro, se muestran los efectos de la composición de la presente invención, la regeneración del cartílago es favorable, y puede mejorarse la función de la totalidad del cartílago. Estas técnicas son eficaces en los casos en los que una lesión del cartílago cubre un área amplia, y en los casos en los que hay presente cartílago dañado residual.

Ejemplo 10

Ensayo de adherencia de la solución de alginato de sodio

Se analizó la relación entre la viscosidad y la adherencia de la composición de la presente invención utilizando una solución acuosa de alginato de sodio (Kimica Corp.).

50 Procedimiento

Se prepararon soluciones acuosas de soluciones de alginato de sodio (Tabla 2) utilizando tres tipos de soluciones de alginato de sodio para las cuales la viscosidad de una solución acuosa de alginato de sodio al 1 % muestra un valor de 110, de 360 o de 570 mPa • s como resultado de tener diferentes pesos moleculares. Se vertió una cantidad predeterminada de cada solución en un microtubo de centrifuga (diámetro interno: 9 mm, altura: 39 mm) mientras se

impedía la entrada de burbujas de aire, seguido de una rápida medición de la cantidad de tiempo transcurrido hasta que cada solución comenzaba a salir del microtubo cuando se inclinaba en un ángulo de 135 °.

En ese momento se midieron las viscosidades de las soluciones de alginato de sodio utilizando un viscosímetro de tipo B (Toki Sangyo Co., Ltd., Japón) a una temperatura de 20 °C.

5 (Tabla 2)

Muestra							
Solución acuosa de alginato de sodio		Concentración (%)					
Viscosidad al 1 %	110 mPa • s	0,5	1,0	1,5	2,0	2,5	3,0
	360 mPa • s	0,5	1,0	1,5	2,0	2,5	3,0
	570 mPa • s	0,5	1,0	1,5	2,0	2,5	3,0

Resultados

10 En la FIG. 15 se muestran las relaciones entre la concentración de cada solución de alginato de sodio y el tiempo de adhesión. Los tiempos de adhesión de cada uno de los tres tipos de soluciones de alginato de sodio aumentaron cuando aumentó la concentración de las soluciones, y se determinó que la adherencia aumentaba. Además, una comparación de los tres tipos de soluciones de alginato de sodio reveló que la selección de una solución de alginato de sodio que tiene una elevada viscosidad a una concentración del 1 % produjo una elevada adherencia que permitió la obtención de un tiempo de adhesión más largo.

15 En la FIG. 16 se muestran las relaciones entre la viscosidad de cada tipo de solución de alginato de sodio y el tiempo de adhesión. El tiempo de adhesión se hizo más largo y se mostró una mayor adherencia al aumentar las viscosidades de las soluciones de alginato de sodio. Por lo tanto, se demostró que se obtenía una correlación constante entre la viscosidad y la adherencia de una composición que contiene una sal metálica monovalente del ácido algínico.

20 Sobre la base de estos hallazgos, cuando se aplicaba la composición de la presente invención a un defecto del cartílago en un estado inclinado u orientado hacia abajo, y después se humedecía, se habían eliminado la sangre y similares del área afectada y se habían satisfecho las condiciones de este experimento, la viscosidad de la composición de la presente invención puede ser ajustada sobre la base de este resultado. Por ejemplo, la viscosidad de la composición de la presente invención puede ser ajustada a aproximadamente 2.000 mPa • s o más para obtener un tiempo de adhesión de aproximadamente 5 segundos, a una viscosidad de entre aproximadamente 3.000 y 4.000 mPa • s o más para obtener un tiempo de adhesión de aproximadamente 10 segundos, a entre 25 aproximadamente 7.000 y 8.000 mPa • s o más para obtener un tiempo de adhesión de aproximadamente 20 segundos, y a una viscosidad de entre aproximadamente 8.000 y 9.000 mPa • s o más para obtener un tiempo de adhesión de aproximadamente 30 segundos.

30 Sin embargo, en el caso de aplicarla realmente en un área afectada, el tiempo de adhesión varía dependiendo de factores tales como la cantidad de la composición inyectada y la forma del sitio inyectado. Particularmente, en los casos en los que sólo se inyecta una pequeña cantidad de la composición, dado que factores tales como la tensión superficial también presentan un efecto además de la viscosidad, es posible una adherencia a largo plazo incluso con una baja viscosidad.

35 El tiempo de adhesión objetivo puede ser obtenido según el tipo de procedimiento usado teniendo adecuadamente en consideración otros factores tales como las características del viscosímetro usado para la medición, la temperatura ambiente, la cantidad de células incorporadas y el estado de la composición de la presente invención.

Ejemplo 11

Medición de la distribución del peso molecular del alginato de sodio purificado

(1) Procedimiento

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

- Columna: TSKgel GMPWx1, 2 columnas + TSKgel G2500PWx1, 1 columna (Tosoh Corp.) (diámetro de 7,8 mm x 300 mm x 3 columnas)
- Temperatura de la columna: 40 °C
- 45 Eluido: solución acuosa de nitrato de sodio 200 mM
- Concentración de la muestra: 0,05 %
- Caudal: 1,0 ml/min

Volumen de inyección: 200 µl

Detector: RI (refractómetro diferencial)

Patrones: pululano, glucosa (pesos moleculares: 1-600.000, 788.000, 404.000, 212.000, 112.000, 47.300, 22.800, 11.800, 5.900, 180)

5 (2) Resultados

(Tabla 3)

Muestra para la medición	Peso molecular medio en número (Mn)	Peso molecular medio en peso (Mw)	Cociente de varianzas (Mw/Mn)	(Referencia) Viscosidad de una solución acuosa al 1 %
Alginato de sodio purificado (Kimica Corp., Mochida International Ltd., Sea Matrix™ (esterilizado), nº de serie B5Y01)	430.000	1.700.000	4,0	De entre 400 y 500 mPa • s
Alginato de sodio purificado (Pronova™ SLG20, FMC Biopolimer Inc.)	66.000	440.000	6,6	De entre 20 y 100 mPa • s

(3) Análisis

10 El peso molecular medio en peso del alginato de sodio purificado usado en el modelo de reparación de cartílago de conejo del Ejemplo 7 era de 1.700.000, medido utilizando el procedimiento descrito anteriormente. Según se indica en el Ejemplo 7, el alginato de sodio mostró unos efectos regenerativos del cartílago hialino en el modelo de reparación de cartílago de conejo tanto con, como sin, células. Por otro lado, aunque se llevó a cabo un experimento similar utilizando un ácido algínico con un bajo contenido en endotoxinas (Pronova™ LVG, actualmente Pronova™ UP LVG, FMC Biopolimer Inc.) según se describe en la Referencia 5, se desvela que se forma cartílago fibroso en el caso de aplicar únicamente un ácido algínico que no contiene células en un defecto del cartílago. Adicionalmente, la versión estabilizada de Pronova™ LVG está indicada como Pronova™ SLG20, el peso molecular medio en peso de la misma determinado mediante el procedimiento descrito anteriormente era de 440.000. A pesar de que Sea Matrix™ y Pronova™ tienen la característica común de ser ácidos algínicos con un bajo contenido en endotoxinas, sus ácidos algínicos difieren en términos del peso molecular, y se cree que esta diferencia da lugar a diferencias en los efectos regenerativos del cartílago. Aunque la viscosidad puede ser ajustada mediante la concentración del ácido algínico, en un experimento en el que se incorporaron condrocitos a diferentes concentraciones de geles de ácido algínico (del 0,5 al 4 %), se trasplantaron por debajo de la piel de los ratones y se confirmó la regeneración del cartílago, se notificó que la concentración de ácido algínico no tenía ningún efecto sobre los efectos de generación de cartílago (Keith T. Paige et al., "De Novo Cartilage Generation Using Calcium Alginate-Chondrocyte Constructs", Plastic and Reconstructive Surgery, Vol. 97: 1996, págs. 168-178). Por lo tanto, se cree que la diferencia en los efectos regenerativos en el cartílago entre Sea Matrix™ y Pronova™ es atribuible al peso molecular. A saber, a pesar de que el uso de un ácido algínico con un bajo contenido en endotoxinas permite la obtención de una composición que tiene una elevada bioafinidad con unos bajos niveles de degeneración y de respuestas inflamatorias en el cartílago circundante, también utilizando un ácido algínico que tiene un elevado peso molecular, se averiguó que puede obtenerse una composición o una composición terapéutica para la regeneración del cartílago que tiene unos efectos regenerativos del cartílago extremadamente superiores, permitiendo la regeneración del cartílago incluso sin células incorporadas en la misma. Un ácido algínico con un bajo contenido en endotoxinas que tiene un peso molecular medio en peso de al menos 500.000 o más, y preferentemente de 650.000 o más, es útil para la regeneración del cartílago, se averiguó que el que tiene un peso molecular medio en peso de entre 1.000.000 y 2.000.000 es más preferible, y se averiguó que el que tiene un peso molecular medio en peso de entre aproximadamente 1.500.000 y 2.000.000 es particularmente preferible.

Ejemplo 12

Modelo de artrosis de conejo (modelo de resección del ligamento cruzado anterior (ACL))

(1) Procedimiento

40 Se creó un modelo de artrosis en ambas articulaciones de la rodilla de conejos blancos japoneses hembra (peso corporal: de entre 2,6 y 2,9 kg) de acuerdo con el procedimiento de Vignon, E. et al. (Vignon, E., Bejui, J., Matieu, P., Hartmann, JD, Ville, G., Evreux, JC, et al., Histological cartilage changes in a rabbit model of osteoarthritis, J. Rheumatol., 1987: 14 (Spec No): 104-6). Se asignaron tres animales (6 rodillas) a cada uno de los siguientes cuatro grupos.

- 45 A) grupo de control (solución salina fisiológica)
 B) grupo con la dosis de la solución de hialuronato de sodio al 1 % (peso molecular: aprox. 900.000, viscosidad: aprox. 2.300 mPa • s)
 C) grupo con la dosis de la solución de alginato de sodio purificado al 1 % (peso molecular: aprox. 1.700.000,

viscosidad: aprox. 500 mPa • s)

D) grupo con la dosis de la solución de alginato de sodio purificado al 2 % (peso molecular: aprox. 1.700.000, viscosidad: aprox. 5.000 mPa • s)

5 Las soluciones desde B) hasta D) se prepararon utilizando solución salina fisiológica. El alginato de sodio purificado de C) y D) era el mismo que el alginato de sodio purificado usado en los Ejemplos 1 y 7 (Kimica Corp., Mochida International Ltd., Sea Matrix (esterilizado), nº de serie B5Y01).

10 Después de la resección del ligamento cruzado anterior, se administró cada una de las soluciones desde A) hasta D) en la cavidad articular en las semanas 4, 5, 6, 7 y 8 (un total de 5 administraciones administradas una vez por semana). Las soluciones fueron administradas utilizando una aguja del calibre 27G mediante la penetración en el tendón rotuliano y la inyección de 0,3 ml/rodilla por administración. Los conejos fueron sacrificados la semana 9 para obtener muestras del tejido articular de la rodilla. No se observó inflamación procedente de infecciones, reacciones a cuerpos extraños o similares en ninguna de las rodillas.

(2) Resultados

(Observaciones generales)

15 Se observó macroscópicamente el aspecto de la totalidad de la articulación de la rodilla (cartílago articular de la rodilla del fémur y la tibia). Estos resultados se muestran en la FIG. 17. En el grupo A (el grupo con la dosis de solución salina fisiológica), se observaron macroscópicamente numerosos hallazgos de artrosis, incluyendo defectos en el cartílago y osteofitos. El grado de lesión del cartílago (tamaño, profundidad) era más leve en los demás grupos que en el grupo A. La puntuación de los hallazgos macroscópicos produjo unos resultados similares.

(Tinción)

20 Las muestras de tejido articular de la rodilla se fijaron con paraformaldehído, se descalcificaron y se incluyeron en parafina. Las muestras fueron evaluadas histológicamente mediante una tinción con safranina-O. Estos resultados se muestran en la FIG. 18. Las porciones superiores de cada figura indican el cartílago femoral, mientras que las porciones inferiores indican el cartílago tibial, y los cambios degenerativos en el cartílago fueron evaluados en el cartílago en ambas ubicaciones. Se observó una disminución en la tinción de la matriz del cartílago y un aumento en la aspereza de la superficie del cartílago en el grupo A (el grupo con la dosis de solución salina fisiológica). En el grupo B (el grupo con la dosis de la solución de hialuronato de sodio al 1 %), aunque la superficie del cartílago era más lisa que en el grupo A, se observó una disminución en la tinción. En el grupo C (el grupo con la dosis de la solución de alginato de sodio purificado al 1 %) y en el grupo D (el grupo con la dosis de la solución de alginato de sodio purificado al 2 %), la superficie del cartílago era lisa y las disminuciones en la tinción eran leves en comparación con los grupos A y B. Además, había presente ácido algínico residual en la superficie del cartílago.

30 Sobre la base de los hallazgos anteriores, una inyección intraarticular de alginato de sodio mostró una acción que inhibía la degeneración del cartílago y que protegía el cartílago en un modelo de artrosis con resección del ACL, y se observó que los efectos eran iguales o mejores a los de la administración de una solución de hialuronato de sodio al 1 % usada como fármaco terapéutico para la artrosis. Además, dado que el alginato de sodio se adhería a la superficie del cartílago, se confirmó que el alginato de sodio mostraba afinidad por el cartílago articular, así como que recubría y protegía las superficies del cartílago.

Ejemplo 13

40 Evaluación de los efectos del ácido algínico de diferentes pesos moleculares en un modelo de artrosis de conejo (modelo de resección del ligamento cruzado anterior (ACL))

(1) Procedimiento

45 Se creó un modelo de artrosis en ambas articulaciones de la rodilla de conejos blancos japoneses hembras (peso corporal: de entre 2,6 y 2,9 kg) de acuerdo con el procedimiento de Vignon, E. et al. (Vignon, E., Bejui, J., Matieu, P., Hartmann, JD, Ville, G., Evreux, JC, et al., Histological cartilage changes in a rabbit model of osteoarthritis, J. Rheumatol., 1987: 14 (Spec No): 104-6). Se asignaron cinco animales (10 rodillas) a cada uno de los siguientes cinco grupos.

A) grupo de control (solución salina fisiológica)

B) grupo con la dosis de la solución de hialuronato de sodio al 1 % (ARTZ (marca registrada), Kaken Pharmaceutical Co., Ltd., peso molecular: aprox. 900.000, viscosidad: aprox. 2.300 mPa • s)

50 C) grupo con la dosis de la solución de alginato de sodio purificado al 2 % (Pronova™ SLM₂₀, FMC Biopolimer Inc., peso molecular: aprox. 400.000)

D) grupo con la dosis de la solución de alginato de sodio purificado al 2 % (Kimica Corp., esterilizado, peso molecular: aprox. 1.000.000)

55 E) grupo con la dosis de la solución de alginato de sodio purificado al 2 % (Sea Matrix (esterilizado), Kimica Corp., peso molecular: aprox. 1,700.000)

Las soluciones desde C) hasta E) se prepararon utilizando solución salina fisiológica.

Después de la resección del ligamento cruzado anterior, se administró cada una de las anteriores soluciones desde A) hasta E) en la cavidad articular en las semanas 4, 5, 6, 7 y 8 (un total de 5 administraciones administradas una vez por semana). Las soluciones fueron administradas utilizando una aguja del calibre 27G mediante la penetración en el tendón rotuliano y la inyección de 0,3 ml/rodilla por administración. Los conejos fueron sacrificados la semana 9 para obtener muestras del tejido articular de la rodilla. No se observó inflamación procedente de infecciones, reacciones a cuerpos extraños o similares en ninguna de las rodillas.

(2) Resultados

(Observaciones generales)

Se observó macroscópicamente el aspecto de la totalidad de la articulación de la rodilla (cartílago articular de la rodilla del fémur y la tibia). Con objeto de evaluar el grado de lesión en la superficie del cartílago, las muestras se tiñeron con tinta India según el procedimiento de Choji Shimizu et al. y después se puntuaron (J. Rheumatol., Vol. 25, páginas 1813-1819, 1998). Los hallazgos macroscópicos se muestran en la FIG. 19. Cuando se tiñen con tinta India, se colorean los límites entre las lesiones del cartílago y el cartílago normal. En el grupo A (el grupo con la dosis de solución salina fisiológica), se observaron macroscópicamente numerosos hallazgos de artrosis, incluyendo profundos y amplios defectos en el cartílago y osteofitos. El grado de lesión del cartílago (tamaño, profundidad) era más leve en los demás grupos que en el grupo A. Los resultados de la puntuación de los hallazgos macroscópicos se muestran en la FIG. 20. Las articulaciones de la rodilla se observaron en cuatro ubicaciones que consisten en el cóndilo femoral medio (MFC), la meseta tibial media (MTP), el cóndilo femoral lateral (LFC) y la meseta tibial lateral (LTP). El grado de lesión del cartílago era más leve en los grupos B hasta E que en el grupo A en todas estas ubicaciones. Además, el grado de lesión del cartílago tendía a ser más leve en los grupos D y E que en los grupos B y C. Se cree que las diferencias en los efectos inhibidores en los cambios degenerativos del cartílago, los efectos protectores del cartílago y los efectos de reparación del cartílago están presentes debido a diferencias en el peso molecular de ácido algínico.

(Tinción con proteoglicano)

Las muestras de tejido articular de la rodilla se fijaron con paraformaldehído, se descalcificaron y se incluyeron en parafina. Las muestras fueron evaluadas histológicamente mediante una tinción con safranina-O. Estos resultados se muestran en la FIG. 21. Las porciones superiores de cada figura indican el cartílago femoral, mientras que las porciones inferiores indican el cartílago tibial, y los cambios degenerativos en el cartílago fueron evaluados en el cartílago en ambas ubicaciones. Se observó una disminución en la tinción de la matriz del cartílago y un aumento en la aspereza de la superficie del cartílago en el grupo A (el grupo con la dosis de solución salina fisiológica). En el grupo B (el grupo con la dosis de la solución de hialuronato de sodio al 1 %), aunque la superficie del cartílago era más lisa que en el grupo A, se observó una disminución en la tinción. En los grupos con la dosis de la solución de alginato de sodio (los grupos C hasta E), la superficie del cartílago era lisa y la disminución en la tinción era leve en comparación con los grupos A y B. Además, había presente ácido algínico residual en la superficie del cartílago.

(Evaluación histopatológica global)

Las observaciones macroscópicas y las observaciones mediante tinción fueron evaluadas exhaustivamente mediante la puntuación según el procedimiento de Toshiyuki Kikuchi et al. para la evaluación de los efectos de los fármacos administrados (Osteoarthritis and Cartilage, Vol. 4, páginas 99-110, 1996). El cóndilo femoral medio fue evaluado a entre uno y cuatro niveles para los 8 parámetros indicados a continuación, y se usó la puntuación total como una puntuación de lesión de artrosis.

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

Se usó un ANOVA para probar la presencia de una diferencia significativa entre los grupos, y se elaboraron comparaciones subsiguientes entre cada grupo a un nivel de significación de $p < 0,05$ utilizando una prueba post hoc.

Los resultados se muestran en la FIG. 22. Las puntuaciones de las lesiones de artrosis eran significativamente menores en los grupos B hasta E frente al grupo A. Además, aunque se observaron unos efectos superiores en los grupos con las dosis de ácido algínico de mayor peso molecular (los grupos D y E) en comparación con el grupo con la dosis de ácido hialurónico (el grupo B), los efectos en el grupo con la dosis de ácido algínico de bajo peso molecular (el grupo C) eran aproximadamente los mismos que los del grupo con la dosis de ácido hialurónico.

Sobre la base de los hallazgos anteriores, una inyección intraarticular de alginato de sodio mostró una acción que inhibía los cambios degenerativos en el cartílago y que protegía el cartílago en un modelo de artrosis con resección del ACL, y se observó que los efectos eran iguales o mejores a los de la administración de una solución de hialuronato de sodio al 1 % usada como fármaco terapéutico para la artrosis. En particular, el ácido algínico de alto

peso molecular mostró unos efectos terapéuticos superiores al ácido hialurónico. Adicionalmente, aunque los tres tipos de ácido algínico diferían en términos de viscosidad, dado que se observó que el ácido algínico que tiene una viscosidad menor que la viscosidad del ácido hialurónico mostraba unos efectos iguales o superiores a los del ácido hialurónico, se cree que las diferencias en los efectos terapéuticos son atribuibles a diferencias en la sustancia usada y el peso molecular más que a las diferencias en la viscosidad.

En el modelo de artrosis con resección del ACL usado en este experimento, los fármacos fueron administrados comenzando 4 semanas después de la resección del ACL. Por lo tanto, se cree que las disminuciones en las puntuaciones de las lesiones de artrosis observadas en los grupos con dosis de fármaco son el resultado combinado de los efectos que inhiben la progresión de las lesiones debido a la inhibición en los cambios degenerativos del cartílago y a la protección del cartílago, así como por la acción de reparación de las lesiones del cartílago que ya se habían producido. Según el artículo mencionado anteriormente, Toshiyuki Kikuchi citado como referencia en este experimento, se notifica que las puntuaciones de artrosis alcanzan entre 20 y 25 en el grupo con las dosis de soluciones salinas fisiológicas. Dado que la administración del fármaco comenzó la semana 4 después de la resección del ACL en este experimento, existe la posibilidad de que las puntuaciones de artrosis disminuyeran como resultado de una mejora en el estado del cartílago debido a los efectos de los fármacos como resultado del comienzo de la administración a partir de un estado en el que las puntuaciones de artrosis eran de entre aproximadamente 20 y 25. Además, dado que la puntuación para las articulaciones normales es de 8 en el sistema de evaluación usado en este experimento, puede decirse que la puntuación de artrosis media (11,3) en el grupo E (ácido algínico que tiene un peso molecular de 1.700.000) se aproxima a la puntuación de las articulaciones normales, y es una puntuación extremadamente buena.

Ejemplo 14

Estudio del procedimiento de medición del peso molecular del ácido algínico

Se sabe que se obtienen diferentes valores cuando se mide el peso molecular de sustancias de alto peso molecular de origen natural, dependiendo del procedimiento de medición. Según la ASTM F2064-00 (Publicación Internacional ASTM (2006); la American Society for Testing and Materials es una organización comprometida con la estandarización internacional y el establecimiento de especificaciones de los patrones de materiales industriales y los patrones de procedimientos métodos de ensayo), se recomienda el uso de una SEC-MALLS (cromatografía de exclusión por tamaños con detección por dispersión de la luz láser de ángulo múltiple) para la medición del peso molecular. Por lo tanto, se realizó una comparación entre la medición del peso molecular del alginato de sodio usado en el Ejemplo 13 mediante una SEC-MALLS y mediante una cromatografía de filtración en gel según se describe en el Ejemplo 11. Adicionalmente, la SEC-MALLS combina el uso de un detector de dispersión de la luz láser de ángulo múltiple (MALLS) con una cromatografía de filtración en gel.

(1) Procedimiento

La medición mediante una cromatografía de filtración en gel se llevó a cabo de la misma forma que en el Ejemplo 11. Se llevó a cabo una medición mediante SEC-MALLS en las condiciones indicadas a continuación.

Detector de dispersión de la luz láser de ángulo múltiple: DAWN HELEOS
 Columna Wyatt Technology: Shodex SB-806M, 2 columnas (Showa Denko K.K.)
 Eluido: solución acuosa de nitrato de sodio 200 mM
 Caudal: 1,0 ml/min

(2) Resultados

(Tabla 4)

	AL170	AL100	AL40
Peso molecular medio en peso determinado mediante una cromatografía de filtración en gel	1.700.000	1.000.000	410.000
Peso molecular medio en peso determinado mediante una SEC-MALLS	185.000	149.000	128.000
(Referencia) Efectos farmacológicos del Ejemplo 13	Muy buenos	Muy buenos	Buenos

Se usa el mismo alginato de sodio purificado (con un bajo contenido en endotoxinas) usado en el Ejemplo 13 para AL170, AL100 y AL40.

AL170: Kimica Corp., Mochida International Ltd., Sea Matrix (esterilizado), viscosidad al 1 %: aprox. 500 mPa • s
 AL100: Kimica Corp., esterilizado, viscosidad al 1 %: aprox. 100 mPa • s
 AL40: FMC Biopolimer Inc., Pronova™ SLM₂₀, viscosidad al 1 %: aprox. 30 mPa • s

(3) Análisis

Como se muestra en la Tabla 4, las diferencias en los pesos moleculares de los tres tipos de alginatos determinados mediante una SEC-MALLS sólo se observaron en un intervalo que no indicaba definitivamente una diferencia entre ellos, y aquellos valores diferían considerablemente de los resultados de la medición obtenidos mediante una cromatografía de filtración en gel. Como se muestra en el Ejemplo 13, dado que había unas diferencias bien definidas en los efectos farmacológicos entre las muestras usadas, se averiguó que los pesos moleculares determinados mediante una cromatografía de filtración en gel mostraban una mayor correlación con los efectos terapéuticos de los alginatos que los pesos moleculares determinados mediante una SEC-MALLS, y se averiguó que los pesos moleculares determinados mediante una cromatografía de filtración en gel eran adecuados como parámetros para especificar un intervalo preferible de pesos moleculares de los alginatos usados en la composición para la regeneración del cartílago o en la composición para el tratamiento de una condropatía.

Ejemplo 15

Efectos del ácido algínico sobre el dolor artrítico experimental en ratas

(1) Procedimiento

Las ratas con una artritis inducida mediante una inyección intraarticular de cristales de urato monosódico acicular (MSU) presentan una forma de caminar anormal debido al dolor. Se preparó un modelo de dolor artrítico experimental en ratas a las que se les administró MSU según el procedimiento de Shizuhiko Ihara, et al. (Folia Pharmacol. Japon, Vol. 100, páginas 359-365 (1992)) para evaluar los efectos de la administración intraarticular de alginato de sodio.

Se adquirieron ratas macho Cr1:CD con una edad de 5 semanas y se usaron en el experimento después de un periodo de aclimatación de una semana. Se inyectaron 0,05 ml de una suspensión de solución salina fisiológica al 5,0 % de MSU en la articulación de la rodilla derecha a las ratas bajo anestesia, seguido de una observación de la forma de caminar a las 2, 4, 6 y 24 horas después de la inyección. La forma de caminar fue evaluada mediante una puntuación de desde un hasta cinco grados que consiste en un caminar normal (0 puntos), leve cojera (1 punto), cojera moderada (2 puntos), caminar de puntillas (3 puntos) y caminar sobre tres patas (4 puntos). Se asignaron diez animales a cada uno de los siguientes cinco grupos indicados a continuación.

A) grupo de control (el grupo con la dosis de solución salina fisiológica)

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

C) grupo con la dosis de la solución de alginato de sodio purificado al 2 % (Kimica Corp., esterilizado, peso molecular: aprox. 1.000.000)

D) grupo con la dosis de la solución de alginato de sodio purificado al 1 % (Sea Matrix (esterilizado), Kimica Corp., peso molecular: aprox. 1.700.000)

E) grupo con la dosis de la solución de alginato de sodio purificado al 2 % (Sea Matrix (esterilizado), Kimica Corp., peso molecular: aprox. 1.700.000)

Se administraron 50 µl de cada solución en la misma zona de la articulación una hora antes de la inyección del MSU.

(2) Resultados y análisis

Los cambios con el tiempo en las puntuaciones de la forma de caminar se muestran en la FIG. 23. Las puntuaciones de la forma de caminar del grupo con la dosis de la solución de hialuronato de sodio al 1 % (grupo B) y de los grupos con la dosis de la solución de alginato de sodio al 2 % (los grupos C y E) eran significativamente menores que el grupo de control (el grupo A), y se observaron unos efectos supresores del dolor. Se observaron unos efectos supresores de dolor dependientes de la dosis en comparación con las soluciones al 1 % y al 2 % que contienen alginato de sodio que tiene un peso molecular de aproximadamente 1.700.00 (los grupos D y E). Además, las soluciones de alginato de sodio al 2 % que tienen unos pesos moleculares de 1.000.000 y de 1.700.000 mostraron los mismos efectos supresores del dolor a pesar de tener unas viscosidades diferentes de aproximadamente 300 mPa • s y de aproximadamente 5.000 mPa • s, respectivamente.

En las articulaciones, el MSU actúa directa o indirectamente sobre las células sinoviales y los neutrófilos, y se cree que provoca la artritis a través de la producción de citocinas y similares (la publicación mencionada anteriormente de Shizuhiko Ihara, et al.). A saber, el MSU induce dolor como resultado de la reacción inflamatoria que está siendo así inducida. La solución de alginato de sodio mostró unos efectos supresores de dolor en este modelo, y los efectos observados eran iguales a los del hialuronato de sodio, que se usa como fármaco terapéutico para la artrosis y como un fármaco supresor del dolor de una articulación para la artritis reumatoide crónica. Se confirmó que una sal metálica monovalente del ácido algínico tiene unos efectos que inhiben la inflamación y el dolor, y se cree que es útil como fármaco terapéutico para la artrosis, la periartitis escapulohumeral y similares, siendo también susceptible de ser aplicada en el dolor articular asociado con la artritis reumatoide.

Aplicación industrial

5 Dado que la composición para la regeneración del cartílago de la presente invención no requiere un procedimiento quirúrgico excesivo y puede ser inyectada en una lesión del cartílago, el procedimiento quirúrgico es simple y la regeneración del cartílago, y particularmente la regeneración del cartílago hialino, puede ser favorecida eficazmente sin colocar una carga excesiva en el cuerpo en términos de recolección de condrocitos, periostio y similares.

10 La composición para la regeneración del cartílago de la presente invención tiene una curabilidad en gel como resultado de ser puesta en contacto con iones de Ca en el área afectada. La composición puede ser retenida en el área afectada mediante la curación de la superficie de la misma como resultado del aprovechamiento de esta propiedad. La composición puede usarse en diversas formas de lesiones de cartílago, y es susceptible de acomodar varias condiciones de aplicación.

15 La composición para la regeneración del cartílago de la presente invención es capaz de mostrar unos efectos regenerativos del cartílago hialino incluso sin contener células, como resultado de contener una sal metálica monovalente del ácido algínico con un bajo contenido en endotoxinas. En tal caso, puede reducirse el riesgo de infección por virus y similares atribuible al cuerpo o al procedimiento de cultivo, haciendo así el procedimiento sea más simple.

20 La composición para el tratamiento de una condropatía de la presente invención tiene unos efectos reparadores del cartílago, y efectos que suprimen los cambios degenerativos del cartílago, unos efectos protectores del cartílago, y efectos que inhiben la inflamación del tejido articular y/o unos efectos que suprimen al dolor causado por la inflamación del tejido articular al ser inyectada en una articulación en estado líquido, permitiendo así que muestre sus efectos terapéuticos en una condropatía. La composición es particularmente útil para el tratamiento de la artrosis, el tratamiento de la periartritis escapulohumeral y el alivio del dolor articular asociado con la artritis reumatoide.

LISTADO DE SECUENCIAS

25 <110> MOCHIDA PHARMACEUTICAL CO., LTD. NATIONAL UNIVERSITY CORPORATION HOKKAIDO UNIVERSITY

<120> Composición para el tratamiento de una condropatía

30 <130> PCT08-0009

<150> JP 2007-41520
<151> 21-02-2007

35 <150> JP 2007-277005
<151> 24-10-2007

<160> 10

40 <170> PatentIn versión 3.4

<210> 1
<211> 20
<212> ADN
45 <213> Secuencia artificial

<220>
<223> ADN sintético

50 <400> 1
taagagctcc aaggccaaga 20

55 <210> 2
<211> 20
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> ADN sintético

60 <400> 2
tgtacctact cctttgaccg 20

ES 2 637 163 T3

5	<210> 3 <211> 20 <212> ADN <213> Secuencia artificial <220> <223> ADN sintético	
10	<400> 3 agagacctga actgggcaga	20
15	<210> 4 <211> 22 <212> ADN <213> Secuencia artificial <220> <223> ADN sintético	
20	<400> 4 accacgatat gaggcacagt tt	22
25	<210> 5 <211> 20 <212> ADN <213> Secuencia artificial <220> <223> ADN sintético	
30	<400> 5 gccaggacct ccaggactat	20
35	<210> 6 <211> 19 <212> ADN <213> Secuencia artificial <220> <223> ADN sintético	
40	<400> 6 ctttgacct gttgtccct	19
45	<210> 7 <211> 20 <212> ADN <213> Secuencia artificial <220> <223> ADN sintético	
50	<400> 7 gaggtcgtgg tgaaggtgt	20
55	<210> 8 <211> 20 <212> ADN <213> Secuencia artificial <220> <223> ADN sintético	
60	<400> 8 tgacagtcca tgggtaggt	20

ES 2 637 163 T3

5 <210> 9
<211> 20
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> ADN sintético

10 <400> 9
aagggtacg actggacgct 20

15 <210> 10
<211> 16
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> ADN sintético

20 <400> 10
gtgcagttcg ccgggt 16

REIVINDICACIONES

- 5 1. Una composición para su uso en el tratamiento de una condropatía adecuada para ser inyectada en una articulación, que contiene como principio activo una sal metálica monovalente del ácido algínico con un bajo contenido en endotoxinas que tiene un peso molecular medio en peso de 500.000 o más determinado mediante una cromatografía de filtración en gel, en la que la composición es fluida y no contiene células para la regeneración del tejido del cartílago.
2. La composición para su uso en el tratamiento de una condropatía según la reivindicación 1, en la que dicha condropatía es una artrosis.
- 10 3. La composición para su uso en el tratamiento de una condropatía según la reivindicación 1, en la que dicha condropatía es una periartrosis escapulohumeral.
4. La composición para su uso en el tratamiento de una condropatía según la reivindicación 1, en la que dicha condropatía es un dolor articular asociado con la artritis reumatoide.
5. La composición para su uso en el tratamiento de una condropatía según la reivindicación 1, en la que dicha composición se usa para la inhibición de los cambios degenerativos en el cartílago.
- 15 6. La composición para su uso en el tratamiento de una condropatía según la reivindicación 1, en la que dicha composición se usa para la protección del cartílago.
7. La composición para su uso en el tratamiento de una condropatía según la reivindicación 1, en la que dicha composición se usa para la reparación del cartílago.
- 20 8. La composición para su uso en el tratamiento de una condropatía según la reivindicación 1, en la que dicha composición se usa para la supresión del dolor articular.
9. La composición para su uso en el tratamiento de una condropatía según la reivindicación 1, en la que dicha composición se usa para la inhibición de la inflamación articular.
10. La composición para su uso en el tratamiento de una condropatía según la reivindicación 1, en la que dicha composición se usa para mejorar la función articular.
- 25 11. La composición para su uso en el tratamiento de una condropatía según la reivindicación 1, en la que dicha composición se usa para la regeneración del cartílago hialino.
12. La composición para su uso en el tratamiento de una condropatía según la reivindicación 1, en la que la sal metálica monovalente del ácido algínico es alginato de sodio o alginato de potasio.
- 30 13. Una sal metálica monovalente del ácido algínico con un bajo contenido en endotoxinas que tiene un peso molecular medio en peso de 500.000 o más determinado mediante una cromatografía de filtración en gel para su uso en el tratamiento de una condropatía y para su uso en la inyección en una articulación, en la que la sal metálica del ácido algínico se usa sin células para la regeneración del tejido del cartílago.
- 35 14. La composición para su uso en el tratamiento de una condropatía según la reivindicación 11, que es curada en un área afectada mediante su aplicación en una lesión del cartílago, en la que la composición contiene una sal metálica monovalente del ácido algínico con un bajo contenido en endotoxinas que tiene un peso molecular medio en peso de 500.000 o más determinado mediante una cromatografía de filtración en gel, tiene una viscosidad de entre 400 mPa · s y 20.000 mPa · s determinada mediante un viscosímetro rotacional a 20 °C, y es fluida, y en la que la composición no contiene células para la regeneración del tejido del cartílago.
- 40 15. La composición para su uso en el tratamiento de una condropatía según la reivindicación 14 en la que se aplica un agente de reticulación en la superficie de la composición para curar la composición.

Fig. 1

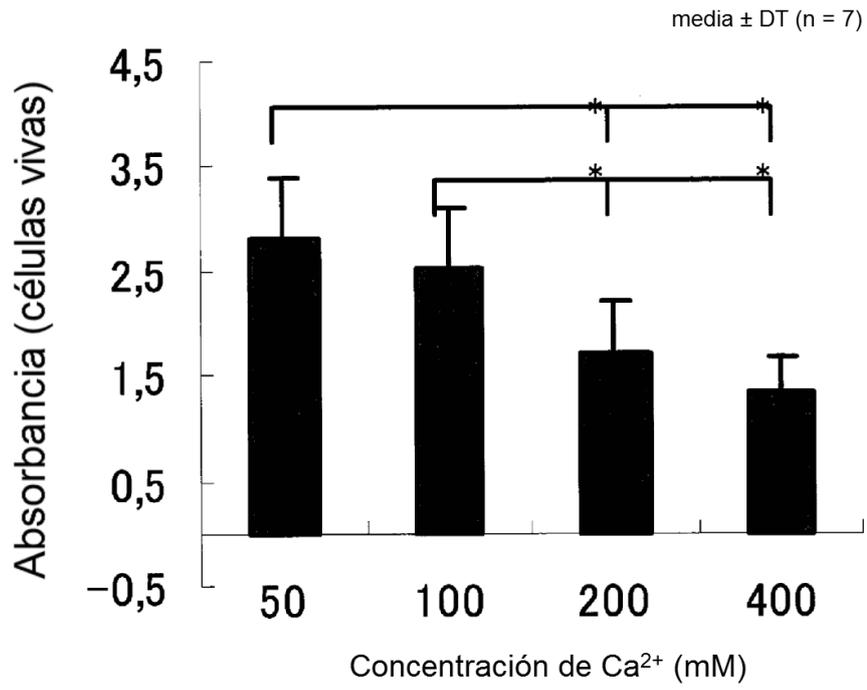


Fig. 2

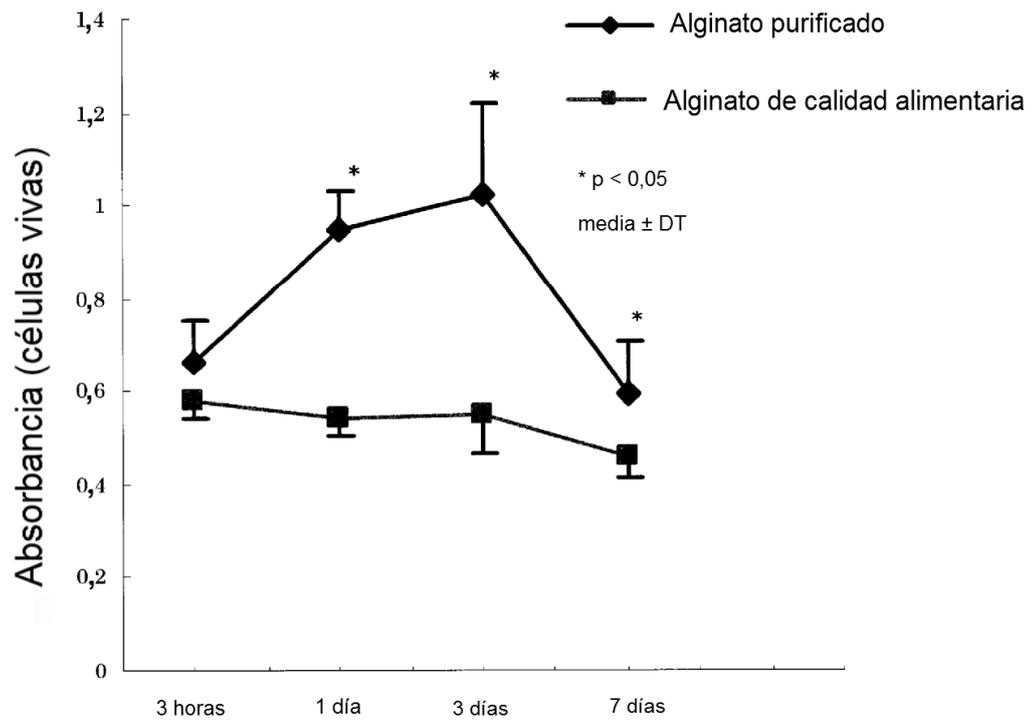


Fig. 3

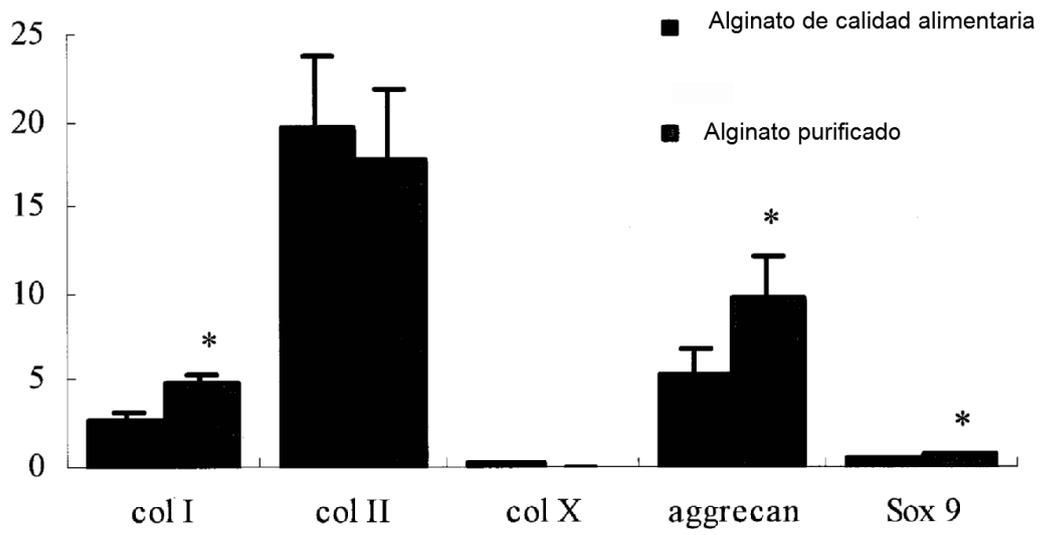


Fig. 4

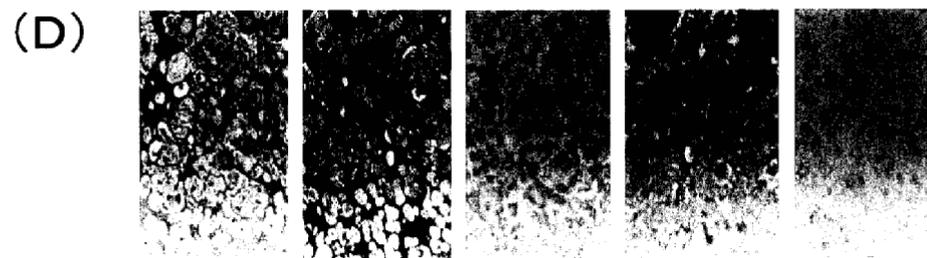
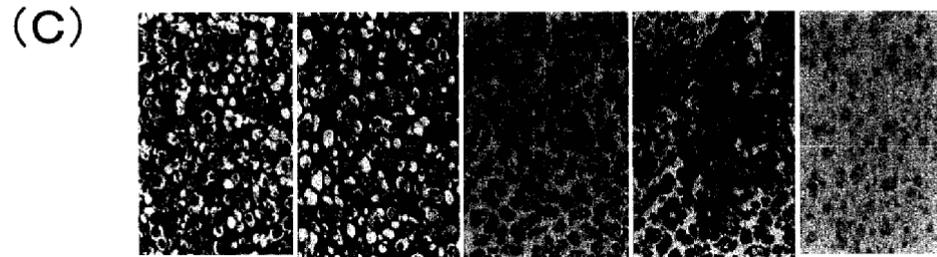
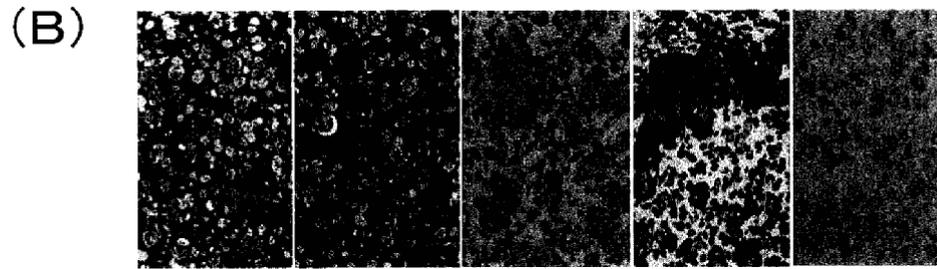
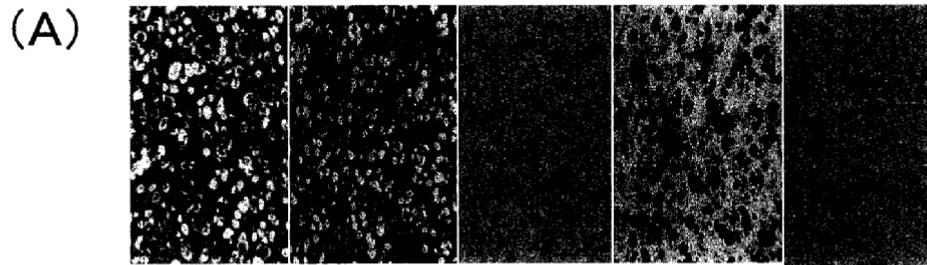


Fig. 5

(A)



(B)



(C)



Fig. 6

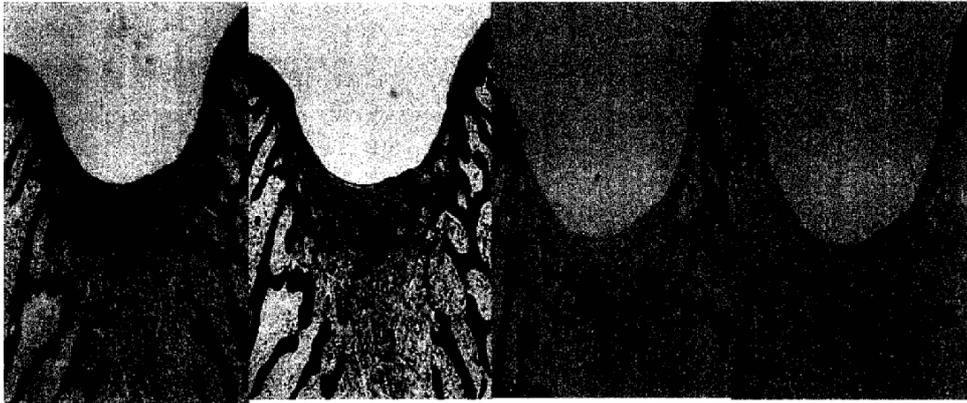
Integración en el borde (tejido nuevo con respecto al cartílago nativo)	Completa	2
	Parcial	1
	Ninguna	0
Suavidad de la superficie del cartílago	Liso	2
	Intermedio	1
	Áspero	0
Superficie del cartílago, grado de relleno	Nivelada	2
	Leve depresión	1
	Desnivel/sobrecrecimiento	0
Color del cartílago, opacidad o translucencia del neocartílago	Transparente	2
	Translúcido	1
	Opaco	0

Fig. 7

Característica		Puntuación
I. Naturaleza del tejido predominante	Cartílago hialino	4
	En su mayor parte cartílago hialino	3
	Cartílago hialino y fibroso mixto	2
	En su mayor parte cartílago fibroso	1
	Algo de cartílago fibroso, en su mayor parte células que no son condrocitos	0
II. Características estructurales	A. Regularidad de la superficie	
	Lisa e intacta	3
	Laminado superficial horizontal	2
	Fisuras	1
	Grave disrupción, incluyendo fibrilación	0
	B. Integridad estructural, homogeneidad	
	Normal	2
	Leve disrupción, incluyendo quistes	1
	Grave desintegración, disrupciones	0
	C. Espesor	
	100 % de cartílago adyacente normal	2
	50 100 % de cartílago normal	1
	0-50 % de cartílago normal	0
	D. Adherencia al cartílago adyacente	
	Adherido en ambos extremos o injerto	2
	Adherido en un extremo o parcialmente en ambos extremos	1
No adherido	0	
III. Libertad en los cambios celulares de degeneración	A. Hipocelularidad	
	Celularidad normal	2
	Ligera hipocelularidad	1
	Hipocelularidad moderada o hiper celularidad	0
	B. Agrupamientos de condrocitos	
	No hay agrupamientos	2
< 25 % de las células	1	
25 100 % de las células	0	
IV. Libertad en los cambios degenerativos en el cartílago adyacente	Celularidad normal. no hay agrupamientos, tinción normal	3
	Celularidad normal, agrupamientos leves, tinción moderada	2
	Hipo/hipercelularidad leve o moderada, ligera tinción	1
	Hipocelularidad grave, poca o ninguna tinción	0
	V. Hueso subcondral	A. Reconstrucción del hueso subcondral
Normal		3
Reconstrucción del hueso subcondral reducida		2
Reconstrucción del hueso subcondral mínima		1
No hay reconstrucción del hueso subcondral		0
B. Respuesta inflamatoria en la región del hueso subcondral		
Ninguna/leve		2
Moderada		1
Grave	0	
VI. Tinción con Safranina-O	Normal o prácticamente normal	3
	Moderada	2
	Ligera	1
	Ninguna	0
	Puntuación máxima total:	Secciones con safranina-O
Sección con H & E		25

Fig. 8

(A)



(B)



Fig. 9

(A)



(B)



Fig. 10

(A)



(B)

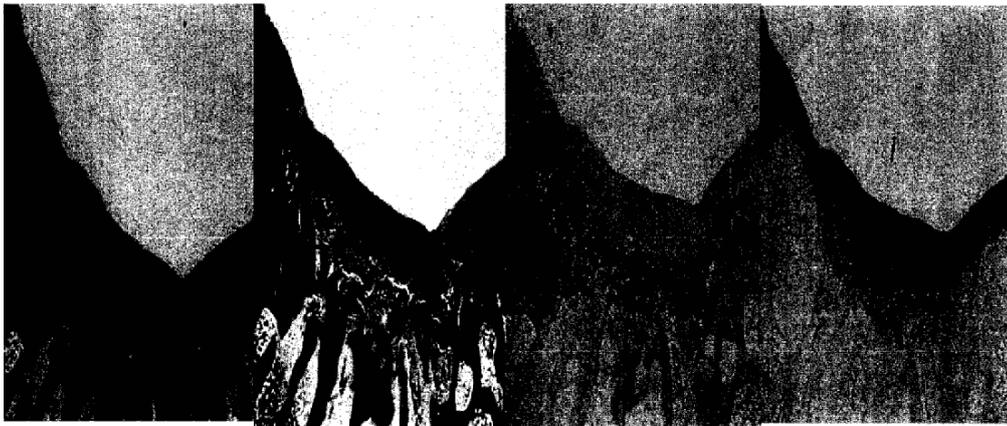
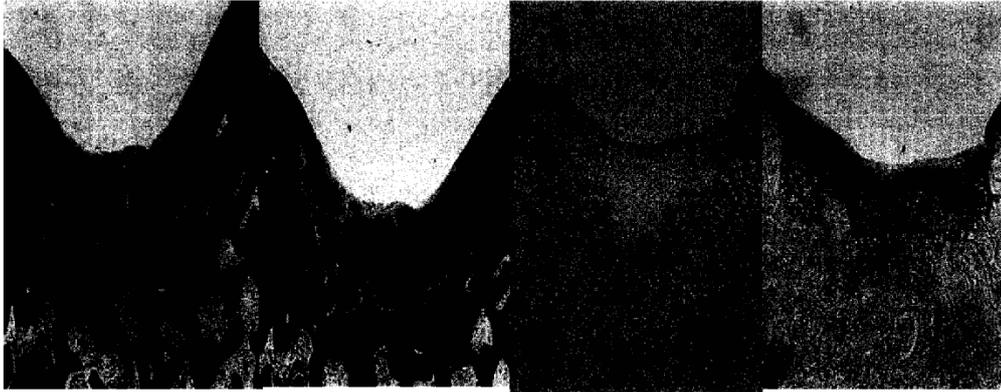


Fig. 11

(A)



(B)



Fig. 12

	4 semanas					12 semanas				
	Control (vacío)	Alimento de calidad alimentaria (sin células)	Alimento de calidad alimentaria + células	Alimento puro (sin células)	Alimento puro + células	Control (vacío)	Alimento de calidad alimentaria (sin células)	Alimento de calidad alimentaria + células	Alimento puro (sin células)	Alimento puro + células
Macro										
Integración en el borde	0,80	0,50	0,50	0,63	0,90	0,71	0,50	1,00	1,00	1,57
Suavidad de la superficie del cartilago	0,20	0,25	0,50	0,75	1,20	0,43	0,75	0,75	1,00	1,43
Superficie del cartilago, grado de relleno	0,20	0,75	0,50	1,13	1,40	0,57	1,00	1,00	1,71	1,71
Color del cartilago	0,20	0,00	0,17	0,63	0,70	0,14	0,25	0,25	0,86	1,00
total	1,40	1,50	1,67	3,13	4,20	1,88	2,50	3,00	4,57	5,71
Histológica										
Naturalza del tejido predominante	0,40	0,75	0,50	0,75	1,50	0,14	0,75	0,50	1,57	1,29
Regularidad de la superficie	0,00	0,25	0,33	1,00	1,50	0,28	0,50	0,75	1,14	2,00
Integridad estructural, homogeneidad	0,80	1,00	0,67	0,50	0,90	0,43	0,75	0,75	1,00	1,00
Espesor	0,60	1,00	1,17	1,00	1,70	0,57	1,00	1,25	1,57	1,86
Adherencia al cartilago adyacente	0,80	0,25	0,67	1,00	1,30	0,71	0,50	1,25	1,43	1,71
Hipo celularidad	0,00	0,25	0,33	0,38	0,80	0,00	0,50	0,25	0,57	0,43
Agrupamiento de condrocitos	0,00	0,50	0,50	0,25	0,20	0,00	0,50	0,25	0,29	0,43
Cambios degenerativos en el cartilago adyacente	1,20	0,75	1,50	1,88	2,80	1,29	0,75	2,00	2,57	2,86
Reconstrucción del hueso subcondral	0,80	0,50	1,17	1,00	1,30	1,14	1,00	2,25	1,71	2,14
Respuesta inflamatoria	1,40	1,25	1,00	1,63	1,70	1,71	0,75	1,50	1,86	2,00
Tinción con Safranina-O	0,40	1,00	1,00	0,75	1,30	0,29	0,75	1,00	1,29	1,00
total	6,40	7,50	8,83	10,13	15,00	6,57	7,75	11,75	15,00	17,00
Puntuación total	7,80	9,00	10,50	13,25	19,20	8,43	10,25	14,75	19,57	22,71

Fig. 13

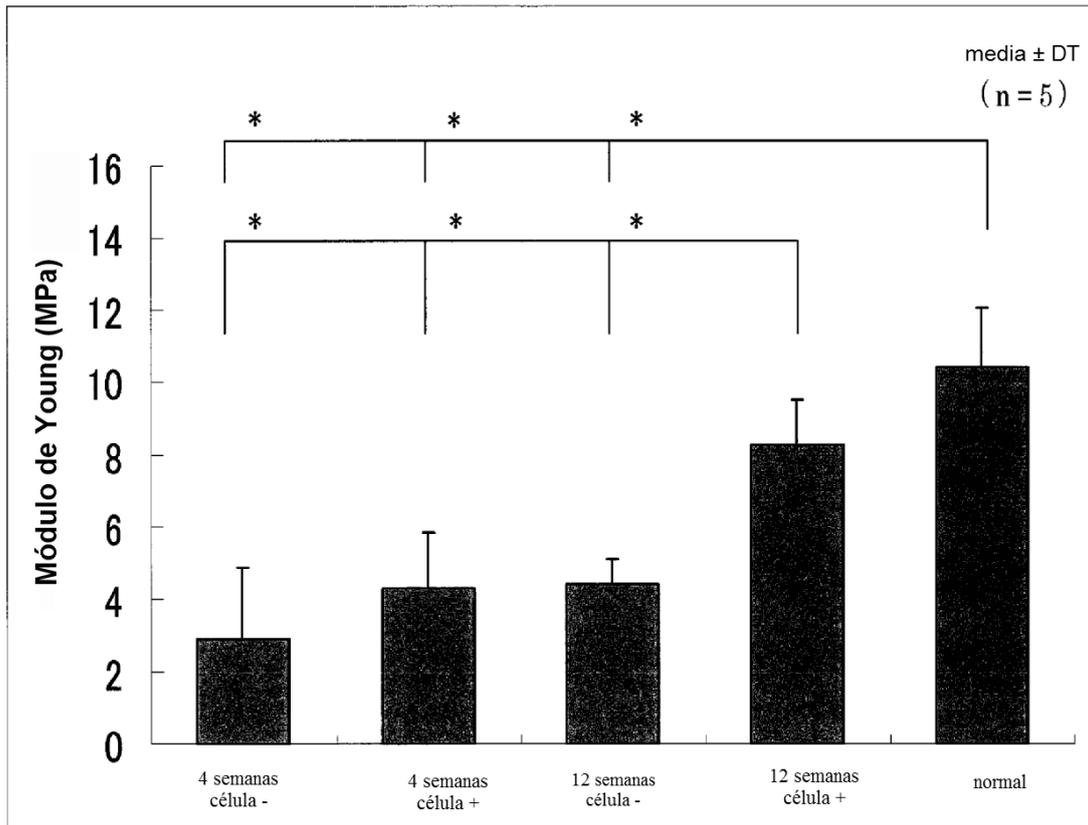
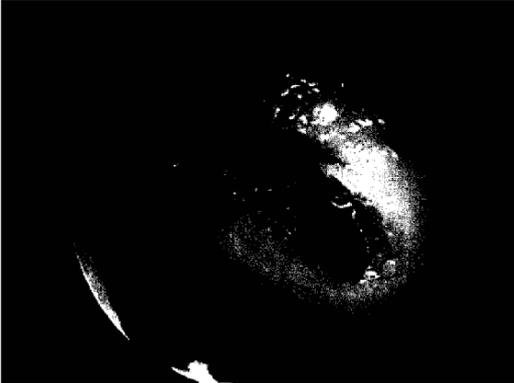


Fig. 14

(A)



(B)



(C)



(D)

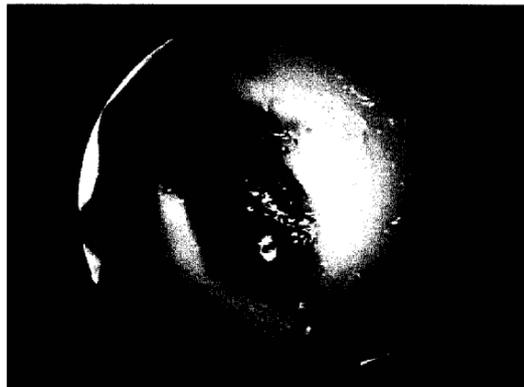


Fig. 15

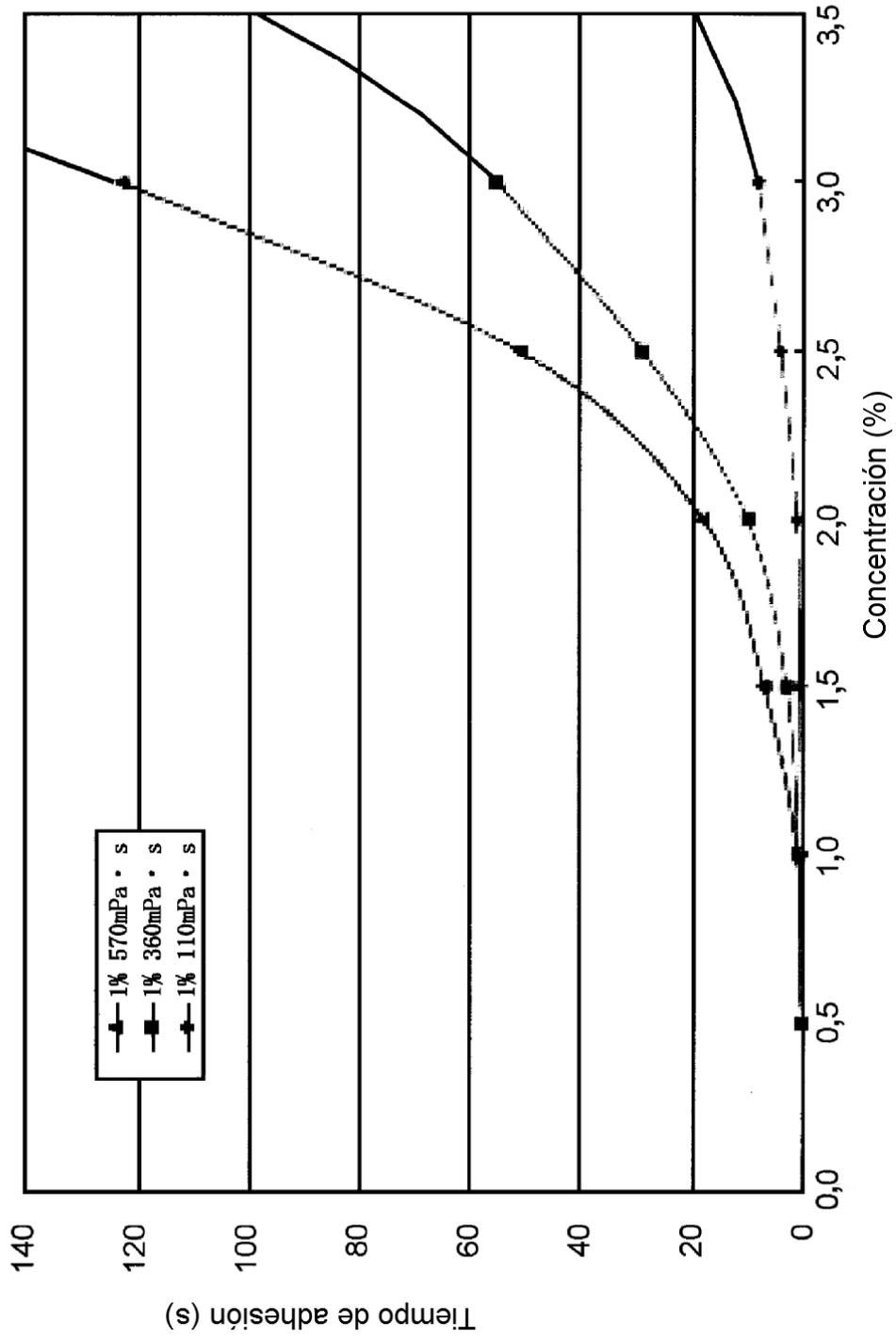


Fig. 16

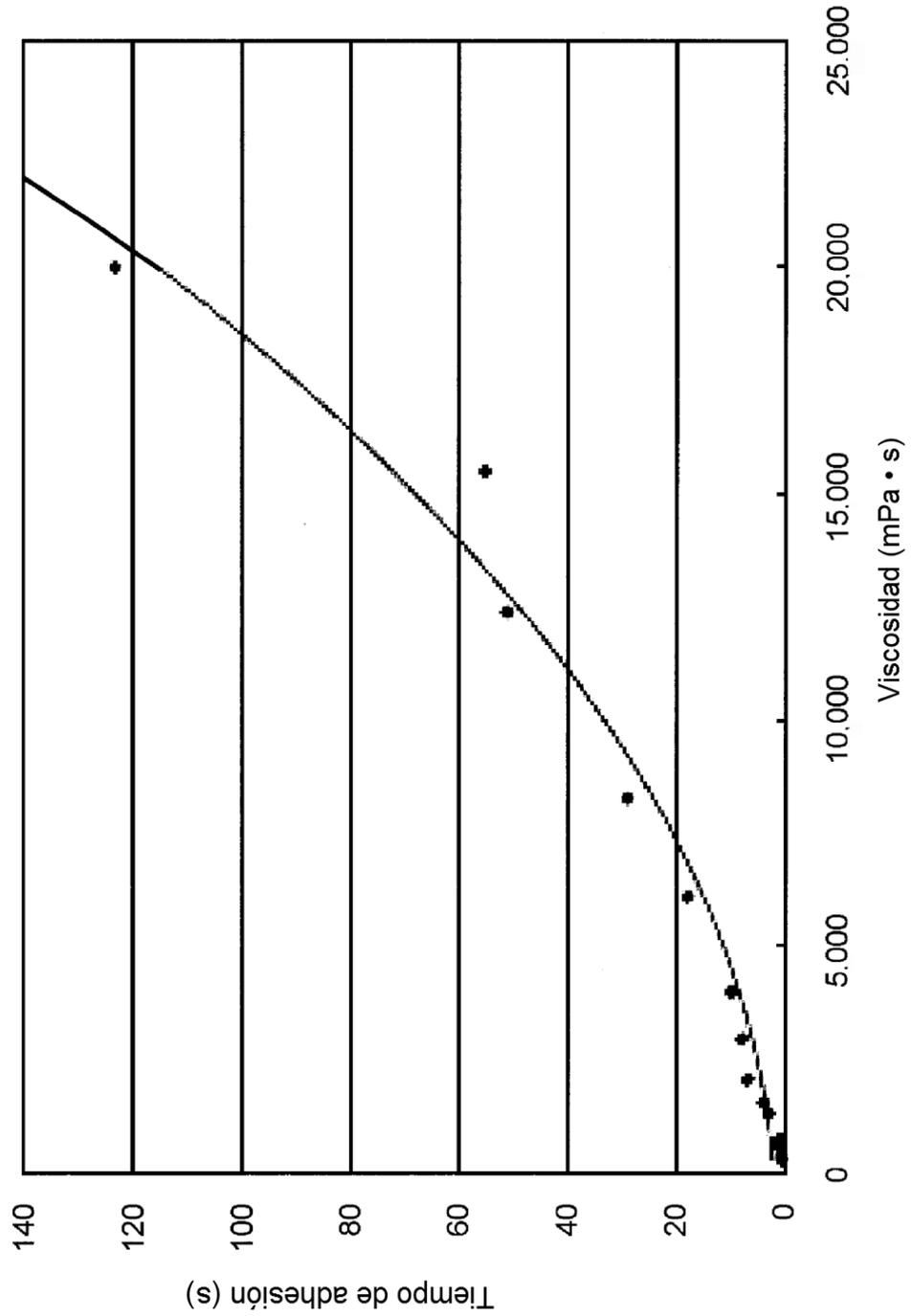


Fig. 17

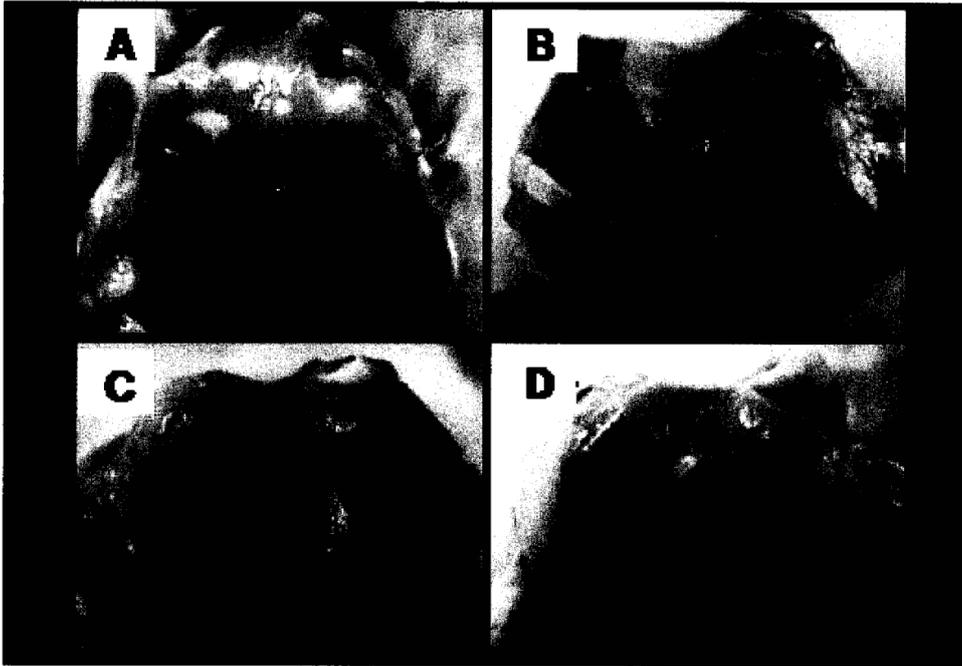


Fig. 18

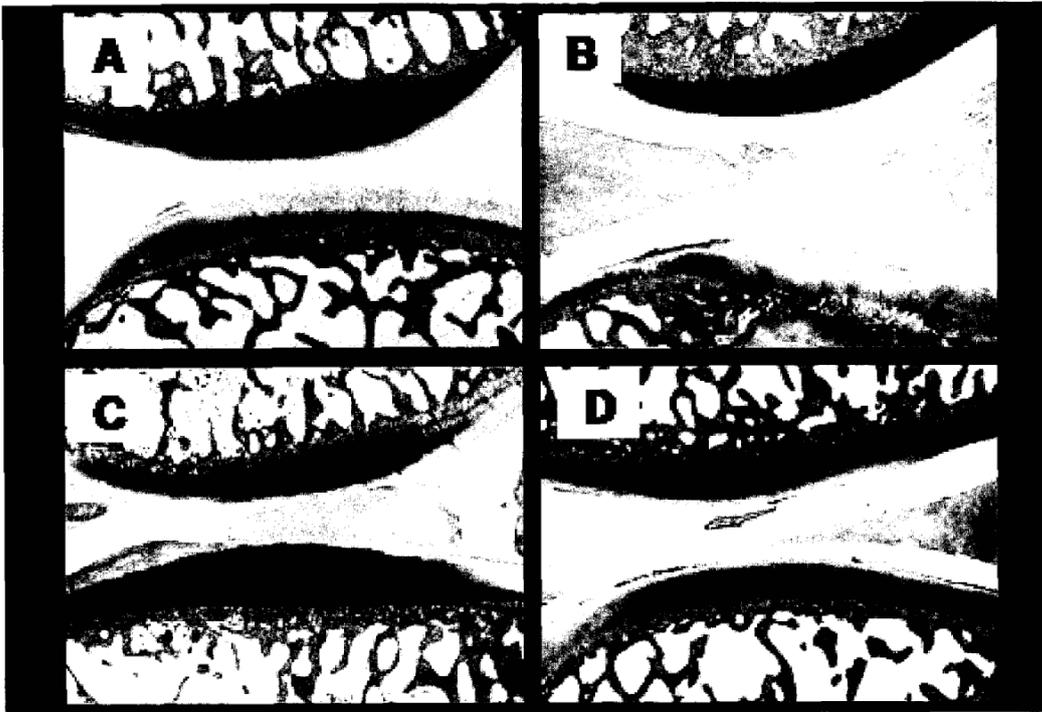


Fig. 19

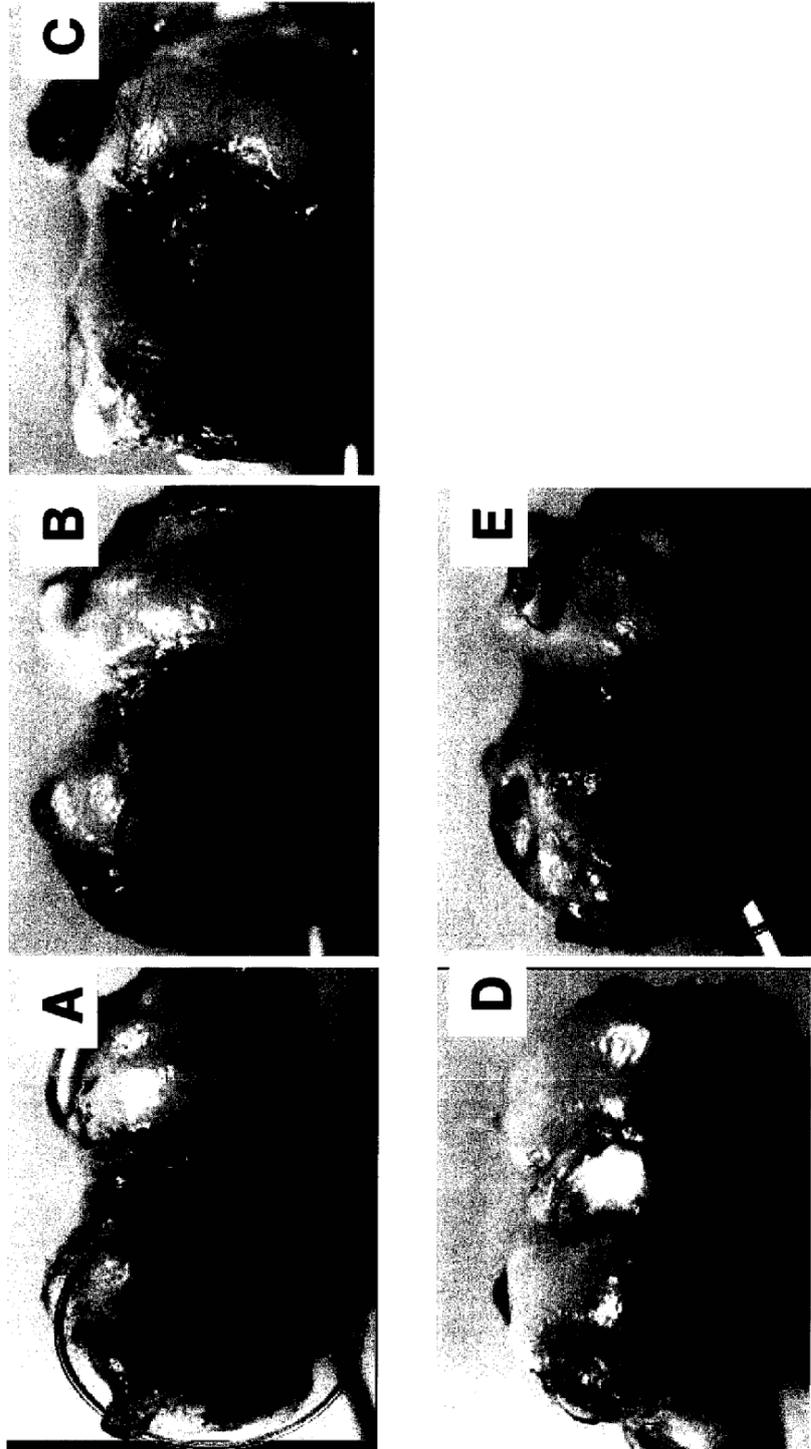
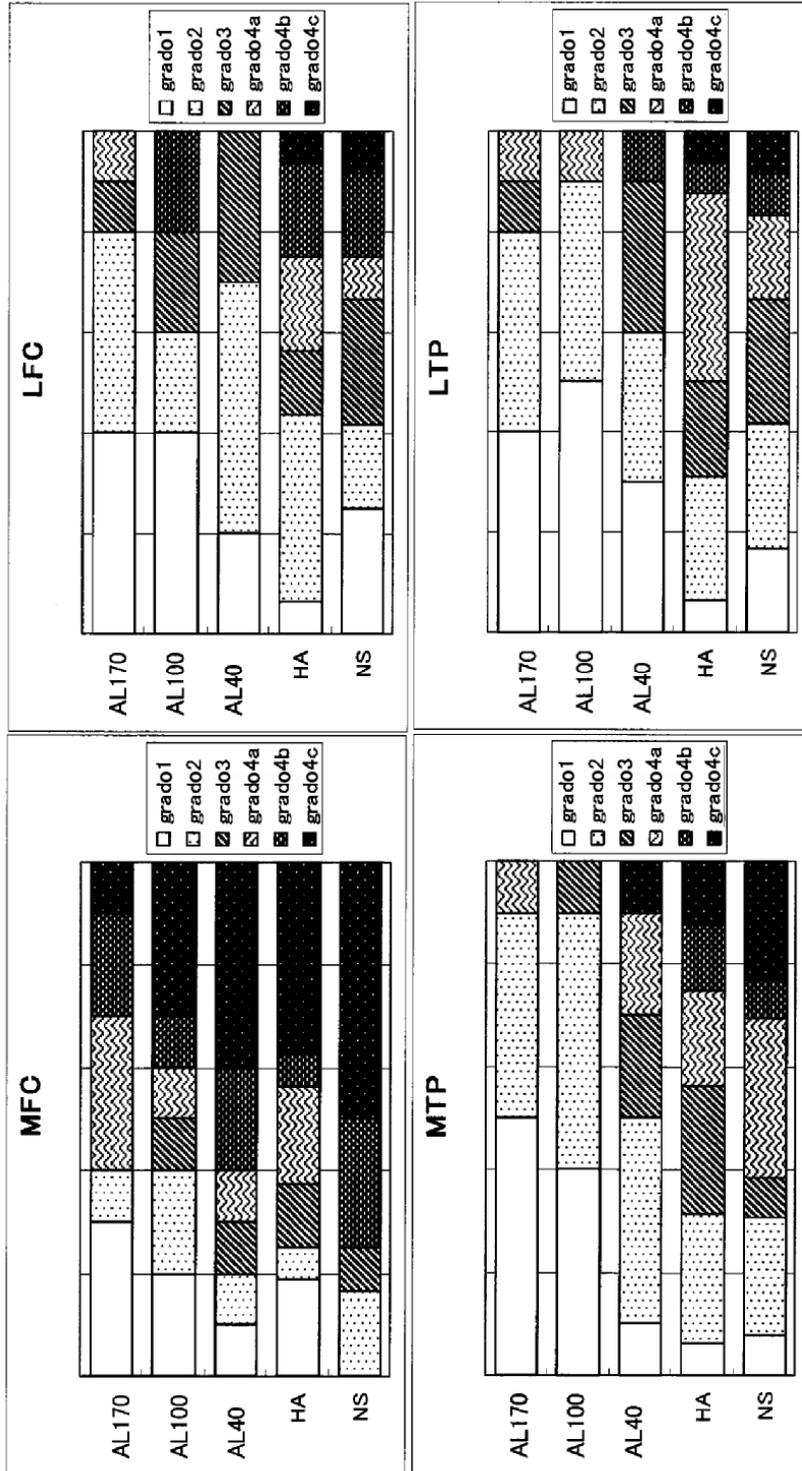


Fig. 20



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

grado 1 no hay captación de tinta India, lo que indica una superficie intacta
 grado 2 mínima captación de tinta India focal, leve irregularidad de la superficie
 grado 3 evidentes y grandes zonas oscuras focales de tinta India, fibrilación abierta
 grado 4a erosión del cartilago < 2 mm
 grado 4b erosión del cartilago 2-5 mm
 grado 4c erosión del cartilago > 5 mm

Fig. 21

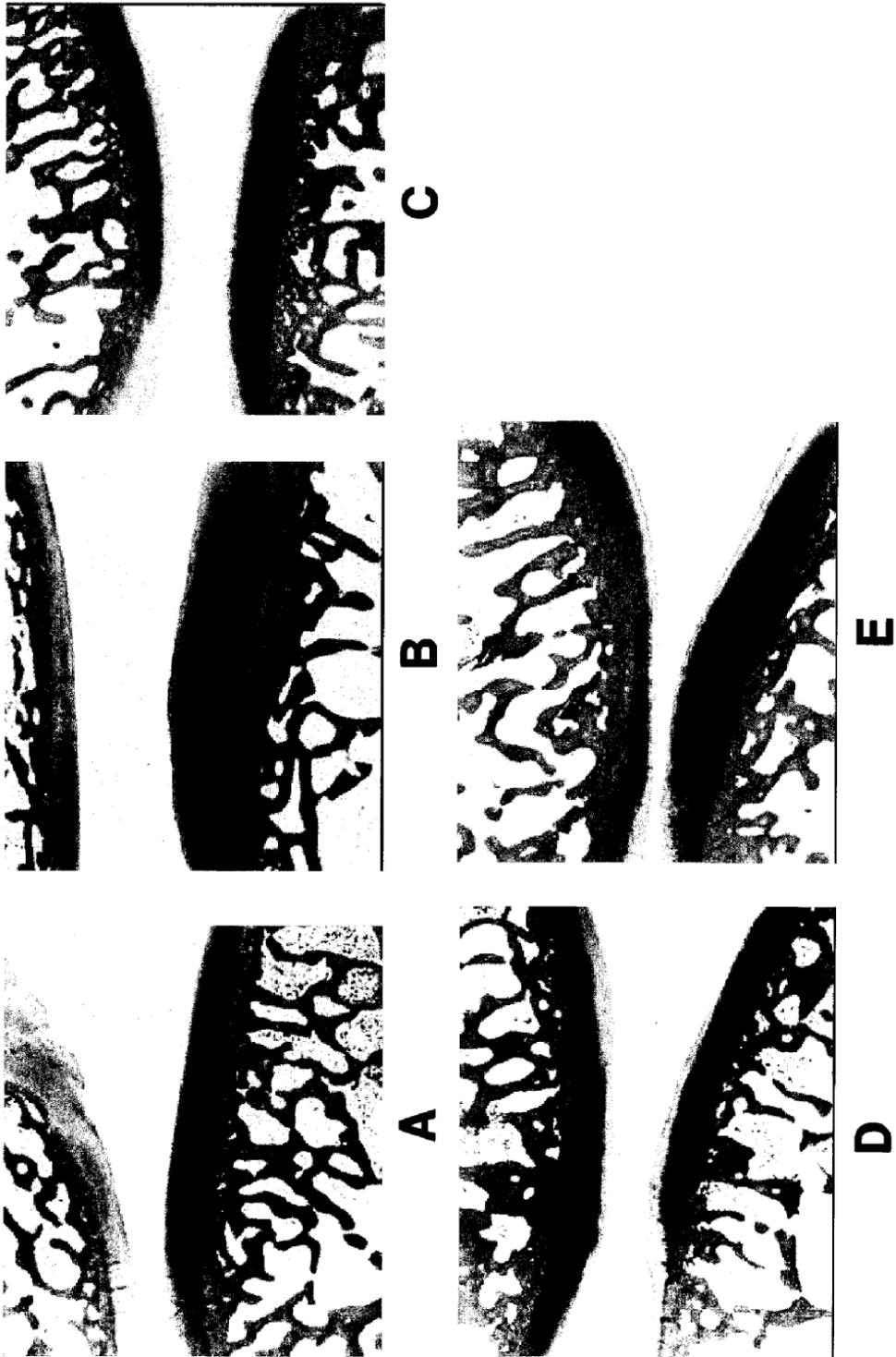


Fig. 22

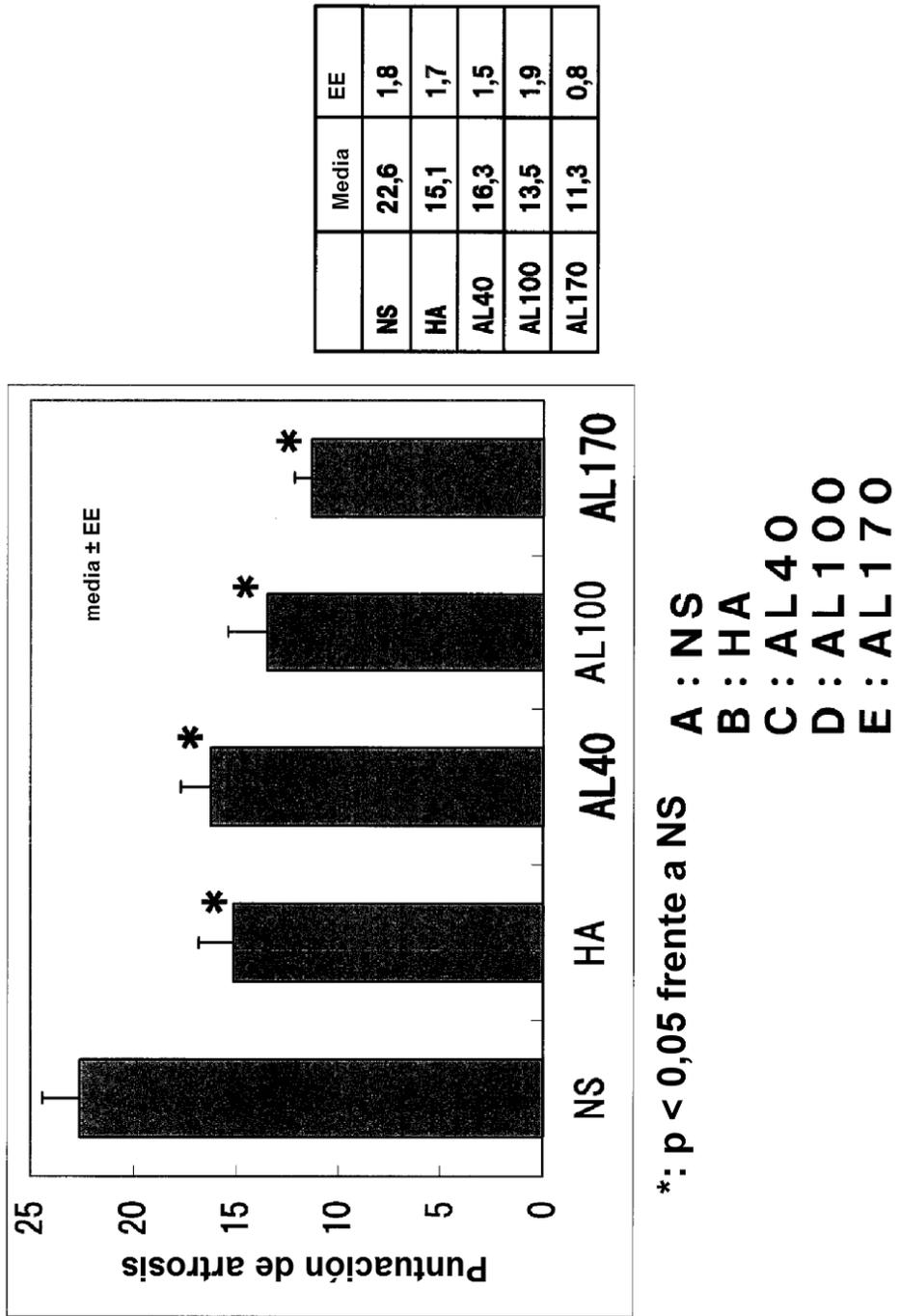


Fig.23

