

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 681 211**

51 Int. Cl.:

**A61K 31/715** (2006.01)

**A61P 19/02** (2006.01)

**C12N 5/077** (2010.01)

**A61K 9/00** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **08.11.2010 PCT/FR2010/052397**

87 Fecha y número de publicación internacional: **23.06.2011 WO11073546**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **08.11.2010 E 10792983 (8)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **18.07.2018 EP 2512432**

54 Título: **Composiciones inyectables de uso intraarticular que asocian un agente de viscosuplementación y un medio de crecimiento de fibroblastos**

30 Prioridad:

**18.12.2009 FR 0959205**

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

**12.09.2018**

73 Titular/es:

**THOREL, JEAN-NOËL (100.0%)  
3 Rue Larochele  
75014 Paris, FR**

72 Inventor/es:

**GATTO, HUGUES**

74 Agente/Representante:

**ISERN JARA, Jorge**

ES 2 681 211 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**

5 Composiciones inyectables de uso intraarticular que asocian un agente de viscosuplementación y un medio de crecimiento de fibroblastos

La presente invención se registra en el desarrollo de soluciones inyectables a nivel intraarticular para el tratamiento de las degeneraciones de las articulaciones, en particular artrosis.

10 Propone asociar un agente de viscosuplementación, tal como ácido hialurónico o una de sus sales, con un medio de crecimiento de fibroblastos de composición bien determinada, y opcionalmente otro polisacárido, de forma ventajosa de origen natural.

15 Estado de la técnica anterior

Al nivel de ciertas articulaciones de los miembros, al lado de las extremidades óseas, protegidos por los cartílagos de la articulación, se insertan en una cápsula tapizada con un tejido conjuntivo, denominado membrana sinovial.

20 El líquido sinovial es el fluido viscoso que rellena la cavidad de la articulación, y que está formado por ácido hialurónico (AH), secretado por las células de tipo fibroblasto de la membrana sinovial (sinoviocitos), y de líquido intersticial filtrado del plasma sanguíneo. El líquido sinovial tiene como función reducir la fricción mediante la lubricación de la articulación, absorber los impactos, proporcionar oxígeno y nutrientes a los condrocitos del cartílago articular y eliminar, de estos últimos, el dióxido de carbono y los residuos metabólicos, en la medida en la que el cartílago no está vascularizado.

25 La artrosis es una afección degenerativa de las articulaciones frecuente, de etiología multifactorial, asociada a una pérdida de material al nivel de los cartílagos las articulaciones. En el transcurso del desarrollo de la afección, se observa una reducción de la concentración y del peso molecular del AH presente en el líquido sinovial. Este fenómeno se explica, por una parte, por una disminución de la síntesis endógena de ácido hialurónico y, por otra parte, por la inflamación que genera radicales libres, responsables de una degradación radicalaria.

30 Estas alteraciones conducen a una reducción de las propiedades viscoelásticas del AH y conducen de forma progresiva a la pérdida de su papel esencial de protección de la articulación. La erosión del cartílago, presencia de fragmentos de cartílago o de hueso en la cavidad de la articulación, dolor, rigidez pueden ser el resultado de estas alteraciones.

35 La viscosuplementación es una opción terapéutica bien establecida que consiste en inyectar AH en la articulación interesada para ayudar a lubricar mejor la articulación, aumentar la movilidad y reducir el dolor. De acuerdo con el grado de gravedad de la artrosis, series de 3 a 5 inyecciones a la semana, por ejemplo al nivel de la rodilla, proporcionan una eficacia de 6 meses a 1 año en una mayoría de los pacientes. Esta opción terapéutica es extremadamente útil, en particular para los pacientes que no toleran, o que no responden a los tratamientos convencionales tales como antiinflamatorios y analgésicos orales, pero que aún no justifican un tratamiento protésico.

45 La mejora de las soluciones de viscosuplementación ha hecho referencia, hasta el momento actual, al aumento del tiempo de permanencia del AH en la articulación, con el objeto de aumentar su eficacia.

50 Por lo tanto, se han descrito métodos de modificación química del AH, de reticulación del AH (documento WO 2007/070547), o la combinación del AH con un poliol (documento WO 2009/024670), para ralentizar la degradación radicalaria, térmica o mecánica del gel de AH *in vivo*.

55 Sin embargo, la duración intraarticular de los productos de viscosuplementación a base de AH, modificado o no, en los que la semivida es de varios días, permanece muy inferior al periodo de duración de su eficacia terapéutica. En efecto, ésta se basa en varias funciones acumuladas:

- función de amortiguador directo de los impactos sobre el cartílago;
- propiedades de captación de los residuos intraarticulares disminuyendo de ese modo su efecto abrasivo;
- protección contra las células de la inflamación y las enzimas que secretan; y
- posible acción directa sobre los receptores del dolor.

60 Por lo tanto existe una necesidad evidente de desarrollar las soluciones terapéuticas para el tratamiento de las degeneraciones de las articulaciones, en particular de la artrosis.

## Descripción de la invención

En este contexto, el Solicitante ha adoptado una iniciativa totalmente nueva. En efecto, la presente invención propone actuar en dos niveles distintos para restablecer un buen funcionamiento de las articulaciones, en particular para el tratamiento de las degeneraciones de las articulaciones, en particular de la artrosis.

Por lo tanto, la presente invención se refiere a una composición inyectable, que asocia a la vez un agente de viscosuplementación y por otra parte, un medio de crecimiento de fibroblastos tal como se define en las reivindicaciones, destinado a revitalizar los componentes celulares de los tejidos conjuntivos de la articulación, en particular sinoviocitos y condrocitos, y en consecuencia para asegurar su regeneración celular así como que la estimulación de sus síntesis endógenas (en ácido hialurónico y los GAG, elementos constitutivos y funcionales fundamentales de las articulaciones).

De forma más precisa, los componentes susceptibles de desempeñar el papel de agente de viscosuplementación en una composición de inyección intraarticular de acuerdo con la invención se eligen entre el listado que sigue a continuación: ácido hialurónico, sulfato de condroitina, queratano, sulfato de queratano, heparina, celulosa y sus derivados, quitosano, xantanos, galactomanano, les alginatos y sus respectivas sales.

En la práctica, el agente de viscosuplementación que se aplica en particular en la presente aplicación intraarticular es el ácido hialurónico o una de sus sales. Es por esto por lo que en un modo de realización en particular, la composición prevista no contiene más que ácido hialurónico o una de sus sales como agente de viscosuplementación en asociación con el medio de crecimiento de fibroblastos.

En un modo de realización alternativa, el ácido hialurónico o una de sus sales se prevé como agente de viscosuplementación principal y se combina, en la combinación prevista, con al menos otro polisacárido, de forma ventajosa de origen natural para asegurar su carácter biocompatible y no inmunógeno. De forma ventajosa este otro polisacárido es un glicosaminoglicano polisulfurado – en particular sulfato de condroitina, queratano, sulfato de queratano -, o incluso heparina, celulosa y sus derivados, quitosano, xantanos, galactomanano, alginatos y sus respectivas sales. La composición contiene además el medio de crecimiento de fibroblastos, y opcionalmente otros componentes.

En la práctica, por lo tanto se trata de combinar una acción mecánica de lubricación y de protección de la articulación con una acción trófica de reactivación fibroblástica que sostiene las síntesis celulares a nivel de la membrana sinovial y del cartílago articular. La primera acción se asegura con el agente de viscosuplementación, de forma ventajosa el ácido hialurónico - reticulado o no, o una de sus sales -, opcionalmente en combinación con uno u otros varios polisacáridos de origen natural. La segunda acción se asegura con el medio de crecimiento de fibroblastos tal como se define a continuación.

De manera conocida, el ácido hialurónico que se usa en el contexto de la presente invención se puede presentar en diferentes formas: sales, derivados tales como ésteres o amidas, en forma lineal o bien químicamente reticulados ("cross-linked"). Todas estas formas son posibles en el contexto de la presente invención. Si la reticulación permite aumentar el periodo de duración de las moléculas de ácido hialurónico en el organismo, estas modificaciones afectan sin embargo sus características fisicoquímicas, sus propiedades biológicas y su inmunogenicidad potencial.

Como se ha mencionado para el ácido hialurónico, el o los polisacáridos de forma ventajosa de origen natural, pueden estar reticulados o no reticulados, injertados o no injertados, de acuerdo con las técnicas de reticulación e injerto que se han descrito en la técnica anterior.

En la búsqueda de una solución técnica tan neutra como sea posible para las estructuras de las articulaciones, denominada "biomimética", el ácido hialurónico no reticulado, así como sales fisiológicamente aceptables, tiene preferencia como el primer componente en la medida en la que esta molécula es un componente natural del líquido sinovial. Por sales de ácido hialurónico fisiológicamente aceptables se hace referencia en particular a las sales de sodio y de potasio, así como sus mezclas.

De manera ventajosa, el agente de viscosuplementación, de forma ventajosa del ácido hialurónico, está presente en la composición a una concentración comprendida entre 1 y 100 mg/ml, de forma ventajosa comprendida entre 10 y 25 mg/ml.

Por lo tanto el segundo componente esencial de la composición de acuerdo con la invención es un medio de crecimiento de fibroblastos tal como se define en las reivindicaciones.

En el contexto de la presente invención, un medio de crecimiento de fibroblastos se define como un medio completo que permite no solamente el mantenimiento de los fibroblastos *in vivo*, pero también estimulando su multiplicación Y sus síntesis celulares (componentes de la matriz extracelular y del líquido sinovial).

La realización de un ensayo funcional de crecimiento permite determinar si un medio dado corresponde a un medio de crecimiento de fibroblastos de acuerdo con la invención. En particular, un ensayo funcional adaptado bien conocido por el experto en la materia es el ensayo de observación de la densidad de las células vivas con método colorimétrico, usando el reactivo WST-1 y una lectura a 450 nm (Berridge, M. V. y *al.* (1996): The Biochemical and Cellular Basis of Cell Proliferation Assays That Use Tetrazolium Salts. *Biochemica* 4, 15-19.)

Por ejemplo un medio de crecimiento de fibroblastos está disponible en el mercado: se trata del medio de cultivo convencional DMEM (Sigma) suplementado con factor de crecimiento celular SVF (suero bovino fetal), hasta un máximo de un 10 % en masa.

De manera general, los medios de este tipo contienen extractos de origen animal o celular que efectivamente tienen un efecto estimulador en el crecimiento de los fibroblastos, pero que presentan el inconveniente de no tener una composición determinada o de contener elementos exógenos no trazables tales como el SVF, extractos de glándula pituitaria de buey, factores de crecimiento celulares EGF ("epidermal growth factor"), FGF ("fibroblast growth factors"), insulina o toxina de cólera, hidrocortisona, piperazina, ...

El medio de crecimiento de fibroblastos que se utiliza en el contexto de la presente invención no contiene factor de crecimiento celular o extracto biológico de origen animal o celular, en particular si éstos no se trazan o no se pueden trazar Ibarra o no tienen una composición determinada.

La expresión "no trazado" o "que no se puede trazar" se refiere a que la fuente de material biológico en cuestión y/o el tratamiento experimentado por el mismo no se pueden establecer o controlar.

En la práctica, de forma ventajosa dicho medio está desprovisto (exento) de extracto biológico de origen animal o celular, de compuesto o factor de crecimiento celular, o de una hormona.

En un modo de realización preferente, por lo tanto se trata de introducir mediante inyección intraarticular un medio de crecimiento de fibroblastos tan compatible como sea posible con el entorno natural de las articulaciones, a saber un medio que comprende componentes biomiméticos y/o biocompatibles (elementos biológicos presentes de forma natural en el organismo o neutros con respecto al mismo, que no induzcan reacciones alérgicas o inflamatorias). De hecho, este medio comprende de forma ventajosa componentes de la sustancia fundamental de los tejidos como conjuntivos.

Un medio de este tipo permite proporcionar de forma específica a los fibroblastos un aporte nutricional optimizado en forma de vitaminas, oligoelementos, aminoácidos, sales minerales, azúcares sencillos (tales como glucosa, ribosa, desoxirribosa) y/o complejos (tales como HA), y factores de crecimiento naturales en forma de componentes de ácidos nucleicos (bases nitrogenadas y pentosas necesarias para la formación de los nucleótidos, así como nucleósidos). Además presenta de forma ventajosa características de pH (entre 6,5 y 7,9, de forma ventajosa entre 7,4 y 7,6 y de osmolaridad (entre 280 y 450 mOsm, de forma ventajosa entre 300 y 350 mOsm) fisiológicas.

Se debe indicar que el ácido hialurónico puede ser a la vez un ingrediente del medio de crecimiento y el agente de viscosuplementación. La diferencia reside a la vez en la forma del AH (necesariamente una sal fisiológica de hialuronato en el medio) y por su cantidad (cantidades más bajas en el medio).

Para estimular el crecimiento de los fibroblastos, un medio de este tipo se puede enriquecer con la ayuda de una sustancia exógena para el organismo, pero de origen natural, que se puede trazar y de composición determinada. Una sustancia que responde a esta definición es por ejemplo una mezcla de péptidos extraídos de la leche, o complejo MPC ("Milk Peptide Complex"), obtenido por precipitaciones sucesivas de la leche y a continuación separación de ciertas proteínas sometidas a hidrólisis enzimática.

Esta sustancia que se presenta en forma de un polvo deshidratado se añade de forma ventajosa al medio a un máximo de 0,5 a 5 mg/ml, incluso de forma más ventajosa de 4 a 5 mg/ml.

El medio complejo que responde a una definición de este tipo fue desarrollado por el Solicitante y corresponde a la asociación de una sesentena de compuestos en cantidades definidas de forma precisa como sigue a continuación:

DENOMINACIÓN INTERNACIONAL NOMENCLATURA DEL INGREDIENTE COSMÉTICO (INCI)	CONCENTRACIÓN FINAL Solución 1 X (en mg/l)
AGUA	c.s.p. 1 litro
CLORURO SÓDICO	5000 a 8000
L-GLUTAMINA o L-ALANIL-GLUTAMINA	100 a 3000

ES 2 681 211 T3

DENOMINACIÓN INTERNACIONAL NOMENCLATURA DEL INGREDIENTE COSMÉTICO (INCI)	CONCENTRACIÓN FINAL Solución 1 X (en mg/l)
BICARBONATO SÓDICO	0 a 2000
D-GLUCOSA	2000 a 5000
HCl de L-ARGININA	300 a 500
ACETATO SÓDICO	200 a 450
FOSFATO DISÓDICO Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	100 a 1500
L-LEUCINA	50 a 200
L-SERINA	50 a 200
CLORURO DE MAGNESIO MgCl <sub>2</sub> , 6H <sub>2</sub> O	50 a 200
CLORURO POTÁSICO	50 a 200
L-VALINA	20 a 150
PIRUVATO SÓDICO	10 a 75
HCl de L-LISINA	10 a 75
HCl de L-HISTIDINA, H <sub>2</sub> O	10 a 75
HCl de L-CISTEÍNA H <sub>2</sub> O	10 a 75
ADENINA (HCl)	5 a 50
L-TREONINA	5 a 50
CLORURO CÁLCICO CaCl <sub>2</sub> , 2H <sub>2</sub> O	0 a 22,5
MIO- INOSITOL	5 a 50
ÁCIDO L-GLUTÁMICO	15 a 75
L-ASPARAGINA H <sub>2</sub> O	15 a 75
L-METIONINA	10 a 50
L-TIROSINA 2Na <sub>2</sub> 2H <sub>2</sub> O	10 a 50
L-FENILALANINA	2 a 20
L-TRIPTÓFANO	2 a 20
L-ALANINA	5 a 30
GLICINA	5 a 30
L-ISOLEUCINA	5 a 30
ÁCIDO L-ASPÁRTICO	10 a 50
SULFATO SÓDICO	1 a 10
SULFATO FERROSO FeSO <sub>4</sub> , 7H <sub>2</sub> O	1 a 10
ÁCIDO FÓLICO	1 a 5
TIMIDINA	0,1 a 3
CIANOCOBALAMINA	0,1 a 3
PANTOTENATO D-CÁLCICO	1 a 5
HCl de TIAMINA	1 a 5
ÁCIDO TIÓCTICO	0,1 a 1
SULFATO DE CINC ZnSO <sub>4</sub> , 7H <sub>2</sub> O	0,05 a 0,5
SILICATO SÓDICO Na <sub>2</sub> SiO <sub>3</sub> , 4H <sub>2</sub> O	0,05 a 0,5
HCl DE PIRIDOXINA	0,5 a 3
NIACINAMIDA (NICOTINAMIDA)	0,5 a 3
RIBOFLAVINA	0,05 a 0,5
d-BIOTINA	0,01 a 0,05
SULFATO DE COBRE CuSO <sub>4</sub> , 5H <sub>2</sub> O	0 a 0,005
MOLIBDATO AMÓNICO (NH <sub>4</sub> ) <sub>6</sub> Mo <sub>7</sub> O <sub>24</sub> , 4H <sub>2</sub> O	0 a 0,005
VANADATO AMÓNICO NH <sub>4</sub> VO <sub>3</sub>	0 a 0,001
CLORURO DE MANGANESO MnCl <sub>2</sub> , 4H <sub>2</sub> O	0 a 0,0001

DENOMINACIÓN INTERNACIONAL NOMENCLATURA DEL INGREDIENTE COSMÉTICO (INCI)	CONCENTRACIÓN FINAL Solución 1 X (en mg/l)
HIALURONATO SÓDICO	100 a 1000
L-PROLINA	10 a 100
HIDROXIPROLINA	10 a 100
ÁCIDO ASCÓRBICO	0,1 a 10
ADENOSINA	0,01 a 1
GUANINA	0,01 a 1
DESOXIRRIBOSA	0,01 a 1
RIBOSA	0,01 a 1
CLORURO DE COLINA	0 a 3
MPC	0 a 5000

5 Como se demuestra a continuación, un medio de este tipo enriquecido posee una capacidad *in vitro* para estimular el crecimiento de los fibroblastos en varios días. Además, permite un crecimiento de los fibroblastos estimulados en presencia de suero. Por lo tanto constituye un candidato particularmente adecuado en el contexto de una inyección intraarticular, en la medida en la que una parte del líquido sinovial se exfiltra del plasma sanguíneo.

Además y como se demuestra en la presente solicitud, la incubación de fibroblastos en este medio aumenta la capacidad de estas células para hacer frente al estrés oxidativo, teniendo por lo tanto propiedades antirradicalarias.

10 Por lo tanto, *in vitro*, el medio enriquecido ejerce un efecto inhibitor sobre el exceso de producción mitocondrial de las especies reactivas de oxígeno (ion superóxido) por fibroblastos expuestos a un inhibidor de la cadena respiratoria (antimicina A). La cinética de expresión de un control fluorescente de oxidación (DCFDA) también se reduce de forma significativa para fibroblastos humanos incubados previamente en el medio de crecimiento y sometidos a un shock oxidativo químico (AAPH), con respecto a los fibroblastos de control incubados previamente en medio DMEM  
15 convencional. Por lo tanto las propiedades antirradicalarias del medio de crecimiento de fibroblastos le proporcionan también un papel de protección del ácido hialurónico con respecto a la degradación radicalaria en la articulación, susceptible de aumentar la duración de este compuesto *in situ* y para poder prolongar la eficacia terapéutica de la viscosuplementación.

20 Por lo tanto, el “medio de crecimiento de fibroblastos” de acuerdo con la invención que se puede denominar “medio natural completo de supervivencia y de crecimiento de los fibroblastos”, debe presentar las siguientes características:

25 a/ composición determinada, trazable, que no comprenda factores de crecimiento celular presentes de forma natural en el organismo o neutros con respecto al mismo (aminoácidos, péptidos, vitaminas, oligoelementos, sales minerales, azúcares sencillos y complejos, ácidos nucleicos), con la exclusión de cualquier sustancia de origen no natural, de composición no definida o incluso medicamentosa;

30 b/ que permita por una parte, por sí solo, la supervivencia de los fibroblastos en cultivo;

c/ y por otra parte que estimule su crecimiento y su metabolismo (y por lo tanto sus producciones celulares).

35 Una composición de acuerdo con la invención puede contener además otros ingredientes o excipientes, usados en particular en la presente aplicación, en particular derivados o fracciones purificadas del AH. Sin embargo, de acuerdo con un modo de realización en particular, la composición inyectable no comprende más de los dos componentes que se han descrito anteriormente: agente de viscosuplementación, de forma ventajosa ácido hialurónico combinado opcionalmente con uno o varios otros polisacáridos de origen natural por una parte, y medio de cultivo de fibroblastos por otra parte.

40 Como ya se ha mencionado, la presente composición tiene como objeto su inyección a nivel intraarticular, en la cavidad de la articulación de un sujeto.

45 En el sentido de la presente invención, el término “sujeto” se refiere a un mamífero, preferentemente un ser humano, pero también se puede referir a un animal sometido a un tratamiento veterinario, en particular los animales de compañía o de ocio (por ejemplo perros, gatos o caballos).

A priori, todas las articulaciones se pueden tratar con la ayuda de una composición de acuerdo con la invención. La rodilla es una articulación a la que se dirige preferentemente en el sujeto humano. En el perro, una articulación

tratada en particular es la cadera, mientras que en el caballo, de forma ventajosa se trata del carpo, el menudillo o el corvejón.

5 De acuerdo con un modo de realización ventajosa, la composición, de forma ventajosa acuosa, se presenta en forma de un gel, debido a la aplicación inyectable que forma el objeto de la invención. De manera notable, esta limitación es exactamente compatible con los medios de crecimiento de los fibroblastos que se han descrito anteriormente, que se pueden formular en forma de gel, gracias a la incorporación de ácido hialurónico, sin adición de excipientes exógenos.

10 Incluso de forma más ventajosa, la composición se presenta en forma de un hidrogel monofásico, a saber un hidrogel en forma de una sola fase homogénea. La viscosidad de la composición obtenida se puede ajustar fácilmente, en particular adaptando la composición y la cantidad del ácido hialurónico para obtener propiedades reológicas similares a las del líquido sinovial.

15 Por lo tanto y a modo de ejemplo, se ha mostrado que una composición de acuerdo con la invención que presenta una osmolaridad comprendida entre 300 y 350 mOsm, un pH comprendido entre 7,4 y 7,6 y una concentración de ácido hialurónico de peso molecular de 1,3 a 1,8 MDa comprende entre 10 y 25 mg/ml siendo totalmente compatible con la aplicación que se tiene como objeto.

20 La composición inyectable de acuerdo con la invención también puede ser el objeto de un kit que comprende además jeringas para contener dicha composición. Por ejemplo se trata de jeringas de una sola dosis de 2 a 20 ml. En un kit de este tipo, los 2 componentes esenciales de la composición se pueden presentar como mezcla en una misma jeringa, o en 2 jeringas distintas para una mezcla extemporánea.

25 Teniendo en cuenta el carácter inyectable y el objeto terapéutico de una composición de este tipo, ésta se somete de forma ventajosa a esterilización, esterilización que tiene lugar de forma ventajosa en frío con el fin de no desnaturalizar los componentes presentes. Esta etapa se puede realizar por ejemplo mediante filtración sobre una membrana de 0,22 µm para el medio de crecimiento de los fibroblastos, y mediante esterilización separada de acuerdo con un proceso conocido por el experto en la materia para el ácido hialurónico.

30 Otra alternativa consiste en proponer la composición inyectable en forma de un polvo (AH y medio de crecimiento de fibroblastos), en frascos de vidrio, de polipropileno, de polietileno o cualquier otro material que pueda resistir una esterilización por radiación ionizante o por punto de inflamación térmico. En este modo de realización, el hidrógeno monofásico se reconstituye por adición de agua estéril en el frasco, con la ayuda de una jeringa (estéril), antes de la inyección del producto en la articulación. En este caso, el producto se debe reconstituir en las 2 a 72 horas antes de la inyección.

35 Teniendo en cuenta su modo de acción complementaria, los componentes de la composición de acuerdo con la invención se pueden mezclar y/o administrar de manera simultánea, separada o extendida en el tiempo.

40 Una aplicación directa de la composición de acuerdo con la invención es el tratamiento de las degeneraciones de las articulaciones, en particular de la artrosis.

45 Una composición de acuerdo con la invención está destinada por lo tanto a su utilización como dispositivo médico y/o medicamento.

A continuación la invención se ilustrará de manera no limitante con los ejemplos que siguen a continuación, con el apoyo de las figuras adjuntas.

50 Leyendas de las figuras

La figura 1 ilustra el crecimiento comparado de fibroblastos humanos en cultivo en un medio de crecimiento de fibroblastos de acuerdo con la invención y el medio DMEM convencional (sigma), sin factor de crecimiento.

55 La figura 2 representa los fenómenos de oxidación medidos en un cultivo de fibroblastos humanos expuestos a un estrés oxidativo después de incubación en diferentes medios.

### Ejemplos de realización

60 1/ Utilización de un medio de crecimiento de fibroblastos en una composición inyectable:

a) Composición del medio:

ES 2 681 211 T3

DENOMINACIÓN INTERNACIONAL NOMENCLATURA DEL INGREDIENTE COSMÉTICO (INCI)	CONCENTRACIÓN FINAL Solución 1 X (en mg/l)
AGUA	c.s.p. 1 litro
CLORURO SÓDICO	5000 a 8000
L-GLUTAMINA o L-ALANIL-GLUTAMINA	100 a 3000
BICARBONATO SÓDICO	0 a 2000
D-GLUCOSA	2000 a 5000
HCl de L-ARGININA	300 a 500
ACETATO SÓDICO	200 a 450
FOSFATO DISÓDICO Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	100 a 1500
L-LEUCINA	50 a 200
L-SERINA	50 a 200
CLORURO DE MAGNESIO MgCl <sub>2</sub> , 6H <sub>2</sub> O	50 a 200
CLORURO POTÁSICO	50 a 200
L-VALINA	20 a 150
PIRUVATO SÓDICO	10 a 75
HCl de L-LISINA	10 a 75
HCl de L-HISTIDINA, H <sub>2</sub> O	10 a 75
HCl de L-CISTEÍNA H <sub>2</sub> O	10 a 75
ADENINA (HCl)	5 a 50
L-TREONINA	5 a 50
CLORURO CÁLCICO CaCl <sub>2</sub> , 2H <sub>2</sub> O	0 a 22,5
MIO- INOSITOL	5 a 50
ÁCIDO L-GLUTÁMICO	15 a 75
L-ASPARAGINA H <sub>2</sub> O	15 a 75
L-METIONINA	10 a 50
L-TIROSINA 2Na <sub>2</sub> 2H <sub>2</sub> O	10 a 50
L-FENILALANINA	2 a 20
L-TRIPTÓFANO	2 a 20
L-ALANINA	5 a 30
GLICINA	5 a 30
L-ISOLEUCINA	5 a 30
ÁCIDO L-ASPÁRTICO	10 a 50
SULFATO SÓDICO	1 a 10
SULFATO FERROSO FeSO <sub>4</sub> , 7H <sub>2</sub> O	1 a 10
ÁCIDO FÓLICO	1 a 5
TIMIDINA	0,1 a 3
CIANOCOBALAMINA	0,1 a 3
PANTOTENATO D-CÁLCICO	1 a 5
HCl de TIAMINA	1 a 5
ÁCIDO TIÓCTICO	0,1 a 1
SULFATO DE CINCO ZnSO <sub>4</sub> , 7H <sub>2</sub> O	0,05 a 0,5
SILICATO SÓDICO Na <sub>2</sub> SiO <sub>3</sub> , 4H <sub>2</sub> O	0,05 a 0,5
HCl DE PIRIDOXINA	0,5 a 3
NIACINAMIDA (NICOTINAMIDA)	0,5 a 3
RIBOFLAVINA	0,05 a 0,5
d-BIOTINA	0,01 a 0,05
SULFATO DE COBRE CuSO <sub>4</sub> , 5H <sub>2</sub> O	0 a 0,005



DENOMINACIÓN INTERNACIONAL NOMENCLATURA DEL INGREDIENTE COSMÉTICO (INCI)	CONCENTRACIÓN FINAL Solución 1 X (en mg/l)
MOLIBDATO AMÓNICO (NH <sub>4</sub> ) <sub>6</sub> Mo <sub>7</sub> O <sub>24</sub> , 4H <sub>2</sub> O	0 a 0,005
VANADATO AMÓNICO NH <sub>4</sub> VO <sub>3</sub>	0 a 0,001
CLORURO DE MANGANESO MnCl <sub>2</sub> , 4H <sub>2</sub> O	0 a 0,0001
HIALURONATO SÓDICO	100 a 1000
L-PROLINA	10 a 100
HIDROXIPROLINA	10 a 100
ÁCIDO ASCÓRBICO	0,1 a 10
ADENOSINA	0,01 a 1
GUANINA	0,01 a 1
DESOXIRRIBOSA	0,01 a 1
RIBOSA	0,01 a 1
CLORURO DE COLINA	0 a 3
MPC	0 a 5000

b) Cultivo de fibroblastos humanos

Protocolo

- 5
- Fibroblastos humanos sembrados a baja densidad en placas de 96 pocillos en medio de cultivo convencional DMEM, suplementado con factor de crecimiento celular SVF (Suero Bovino Fetal);
  - Después de 24 h, cultivo en el medio de acuerdo con la invención puro o en el medio DMEM convencional sin factor de crecimiento;
- 10
- Ausencia de renovación de los medios en el transcurso del experimento;
  - Densidad de las células vivas evaluada a T0 y a continuación después de 2, 4, 7 y 9 días, con método colorimétrico (reactivo WST-1).

Resultados

- 15
- El medio de cultivo de acuerdo con la invención permite mantener, solo, el crecimiento de los fibroblastos durante un periodo de duración de 9 días. A partir del 7º días se observa una ralentización del crecimiento celular que se explica por la no renovación del medio (Fig. 1).
- 20
- En medio DMEM sin SVF, se observa una disminución de la viabilidad celular al cabo de 2 días y la ausencia de crecimiento celular a lo largo de todo el estudio (Fig. 1).

En conclusión, vuelve a surgir que el medio de crecimiento de fibroblastos usado de acuerdo con la invención permite la supervivencia y estimular el crecimiento de fibroblastos humanos normales en ausencia de factores de crecimiento exógenos.

25

c) Aumento de la resistencia de los fibroblastos al estrés oxidativo

Protocolo

- 30
- \* Fibroblastos humanos normales en fase de crecimiento sembrados en placas de 96 pocillos, en medio DMEM complementado (10 % de suero de bovino fetal).
  - \* 48 h después, colocación en el medio DMEM (control negativo), en el medio de acuerdo con la invención, o  $\alpha$ -tocoferol (control antioxidante positivo) durante 2 h.
- 35
- \* Aclarado e incubación 25 min con un donante masivo de ROS (shock oxidativo con AAPH) y un revelador (DCFDA) que se hace fluorescente cuando se oxida.
  - \* Velocidad de aparición de la fluorescencia (proporcionará la producción de ROS celular) medida cada 3 minutos.

Resultados

- 40
- \* Inhibición significativa de la fluorescencia (oxidación) para las células incubadas previamente en el medio de acuerdo con la invención (Matricium) con respecto al control negativo DMEM (Fig. 2). El medio de acuerdo con la invención aumenta la capacidad de las células para hacer frente al shock oxidativo.

- \* Efecto inhibitor indirecto del estrés oxidativo (mejora de la homeostasis redox de las células) con una intensidad comparable a la de un antioxidante con un efecto clásico directo ( $\alpha$ -tocoferol captador de radicales libres).

5 En conclusión, vuelve a surgir que este medio ejerce un efecto inhibitor sobre el exceso de producción mitocondrial de especies reactivas del oxígeno (ion superóxido) por fibroblastos expuestos a un inhibidor de la cadena respiratoria (antimicina A). La cinética de expresión de un control fluorescente de oxidación (DCFDA) también se reduce de forma significativa para fibroblastos humanos incubados previamente en el medio de crecimiento y sometidos a un shock oxidativo químico (AAPH), con respecto a los fibroblastos de control incubados previamente en medio DMEM convencional.

10

2/ Preparación de un gel inyectable a la inyección intraarticular:

- Medio de crecimiento de fibroblastos.
- 15 - HA añadido a una concentración comprendida entre 1 y 100 mg/ml y preferentemente a una concentración comprendida entre 10 y 25 mg/ml.
- Formulación de un gel: el ácido hialurónico (AH) se pone en solución en el medio de cultivo de fibroblastos. La concentración de AH determina la viscosidad de la preparación final. A modo de ejemplo, el AH utilizado es hialuronato sódico cuyo peso molecular está comprendido entre 1,3 y 1,8 MDa. El gel inyectable de acuerdo con la invención no comprende ningún aditivo, con el conjunto de los componentes de la fórmula desempeñando a la vez el papel de excipientes y de principios activos.
- 20 - Esterilización: por filtración sobre membrana de 0,22  $\mu$ m para el medio de crecimiento de fibroblastos, y por esterilización separada de acuerdo con un proceso conocido por el experto en la materia para el HA. Otra alternativa consiste en proponer la composición inyectable en forma de un polvo (AH y medio de crecimiento de fibroblastos), en frascos resistentes a una esterilización por radiación ionizante o por inflamación térmico. El hidrógeno monofásico se reconstituye por adición de agua estéril en el frasco, antes de inyección del producto en la articulación.
- 25 - Protocolo de inyección: de acuerdo con la articulación a tratar y la gravedad de la artrosis, se recomienda realizar una inyección a la semana durante 3 a 5 semanas. La duración de la acción es función de la gravedad de las lesiones de la articulación y de la edad del sujeto.
- 30

## REIVINDICACIONES

1. Composición inyectable por vía intraarticular que comprende:

- 5       - al menos un agente de viscosuplementación elegido entre el grupo: ácido hialurónico, sulfato de condroitina, queratano, sulfato de queratano, heparina, celulosa y sus derivados, quitosano, xantanos, galactomanano, alginatos y sus respectivas sales; y
- 10       - un medio de crecimiento de fibroblastos exento de cualquier factor de crecimiento celular y exento de cualquier extracto biológico de origen animal o celular, no trazado y/o de composición indeterminada, constituido por:
- Cloruro sódico a una concentración final comprendida entre 5000 y 8000 mg/l;  
 L-glutamina o L-alanil-glutamina a una concentración final comprendida entre 100 y 3000 mg/l;  
 Bicarbonato sódico a una concentración final comprendida entre 0 y 2000 mg/l;  
 15 D-glucosa a una concentración final comprendida entre 2000 y 5000 mg/l;  
 HCl de L-arginina a una concentración final comprendida entre 300 y 500 mg/l;  
 Acetato sódico a una concentración final comprendida entre 200 y 450 mg/l;  
 Fosfato disódico ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ ) a una concentración final comprendida entre 100 y 1500 mg/l;  
 L-leucina a una concentración final comprendida entre 50 y 200 mg/l;  
 20 L-serina a una concentración final comprendida entre 50 y 200 mg/l;  
 Cloruro de magnesio ( $\text{MgCl}_2, 6\text{H}_2\text{O}$ ) a una concentración final comprendida entre 50 y 200 mg/l;  
 Cloruro potásico a una concentración final comprendida entre 50 y 200 mg/l;  
 L-valina a una concentración final comprendida entre 20 y 150 mg/l;  
 Piruvato sódico a una concentración final comprendida entre 10 y 75 mg/l;  
 25 HCl de L-lisina a una concentración final comprendida entre 10 y 75 mg/l;  
 HCl de L-histidina,  $\text{H}_2\text{O}$  a una concentración final comprendida entre 10 y 75 mg/l;  
 HCl de L-cisteína  $\text{H}_2\text{O}$  a una concentración final comprendida entre 10 y 75 mg/l;  
 Adenina (HCl) a una concentración final comprendida entre 5 y 50 mg/l;  
 L-treonina a una concentración final comprendida entre 5 y 50 mg/l;  
 30 Cloruro cálcico ( $\text{CaCl}_2, 2\text{H}_2\text{O}$ ) a una concentración final comprendida entre 0 y 22,5 mg/l;  
 Mio- inositol a una concentración final comprendida entre 5 y 50 mg/l;  
 Ácido L-glutámico a una concentración final comprendida entre 15 y 75 mg/l;  
 L-asparagina  $\text{H}_2\text{O}$  a una concentración final comprendida entre 15 y 75 mg/l;  
 L-metionina a una concentración final comprendida entre 10 y 50 mg/l;  
 35 L-tirosina  $\text{Na}_2 2\text{H}_2\text{O}$  a una concentración final comprendida entre 10 y 50 mg/l;  
 L-fenilalanina a una concentración final comprendida entre 2 y 20 mg/l;  
 L-triptófano a una concentración final comprendida entre 2 y 20 mg/l;  
 L-alanina a una concentración final comprendida entre 5 y 30 mg/l;  
 Glicina a una concentración final comprendida entre 5 y 30 mg/l;  
 40 L-isoleucina a una concentración final comprendida entre 5 y 30 mg/l;  
 Ácido L-aspártico a una concentración final comprendida entre 10 y 50 mg/l;  
 Sulfato sódico a una concentración final comprendida entre 1 y 10 mg/l;  
 Sulfato ferroso ( $\text{FeSO}_4, 7\text{H}_2\text{O}$ ) a una concentración final comprendida entre 1 y 10 mg/l;  
 Ácido fólico a una concentración final comprendida entre 1 y 5 mg/l;  
 45 Timidina a una concentración final comprendida entre 0,1 y 3 mg/l;  
 Cianocobalamina a una concentración final comprendida entre 0,1 y 3 mg/l;  
 Pantotenato D-cálcico a una concentración final comprendida entre 1 y 5 mg/l;  
 HCl de tiamina a una concentración final comprendida entre 1 y 5 mg/l;  
 Ácido tióctico a una concentración final comprendida entre 0,1 y 1 mg/l;  
 50 Sulfato de cinc ( $\text{ZnSO}_4, 7\text{H}_2\text{O}$ ) a una concentración final comprendida entre 0,05 y 0,5 mg/l;  
 Silicato sódico ( $\text{Na}_2\text{SiO}_3, 4\text{H}_2\text{O}$ ) a una concentración final comprendida entre 0,05 y 0,5 mg/l;  
 HCl de piridoxina a una concentración final comprendida entre 0,5 y 3 mg/l;  
 Niacinamida (nicotinamida) a una concentración final comprendida entre 0,5 y 3 mg/l;  
 55 Riboflavina a una concentración final comprendida entre 0,05 y 0,5 mg/l;  
 D-biotina a una concentración final comprendida entre 0,01 y 0,05 mg/l;  
 Sulfato de cobre ( $\text{CuSO}_4, 5\text{H}_2\text{O}$ ) a una concentración final comprendida entre 0 y 0,005 mg/l;  
 Molibdato amónico ( $(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24}, 4\text{H}_2\text{O}$ ) a una concentración final comprendida entre 0 y 0,005 mg/l;  
 Vanadato amónico ( $\text{NH}_4\text{VO}_3$ ) a una concentración final comprendida entre 0 y 0,001 mg/l;  
 Cloruro de manganeso ( $\text{MnCl}_2, 4\text{H}_2\text{O}$ ) a una concentración final comprendida entre 0 y 0,0001 mg/l;  
 60 Hialuronato sódico a una concentración final comprendida entre 100 y 1000 mg/l;  
 L-prolina a una concentración final comprendida entre 10 y 100 mg/l;  
 Hidroxiprolina a una concentración final comprendida entre 10 y 100 mg/l;  
 Ácido ascórbico a una concentración final comprendida entre 0,1 y 10 mg/l;  
 Adenosina a una concentración final comprendida entre 0,01 y 1 mg/l;  
 65

Guanina a una concentración final comprendida entre 0,01 y 1 mg/l;  
Desoxirribosa a una concentración final comprendida entre 0,01 y 1 mg/l;  
Ribosa a una concentración final comprendida entre 0,01 y 1 mg/l;  
Cloruro de colina a una concentración final comprendida entre 0 y 3 mg/l;  
5 Mezcla de péptidos de leche (MPC) a una concentración final comprendida entre 0 y 5000 mg/l;  
Agua csp 1 litro.

2. Composición de acuerdo con la reivindicación 1, *caracterizada* por que está constituida por:

- 10 - ácido hialurónico o una de sus sales como agente de viscosuplementación; y  
- medio de crecimiento de fibroblastos.

3. Composición de acuerdo con la reivindicación 1, *caracterizada* por que comprende:

- 15 - ácido hialurónico o una de sus sales como agente de viscosuplementación;  
- al menos otro polisacárido, de forma ventajosa de origen natural, e incluso de forma más ventajosa elegido  
entre el grupo de: sulfato de condroitina, queratano, sulfato de queratano, heparina, celulosa y sus  
derivados, quitosano, xantanos, galactomanano, alginatos y sus respectivas sales; y  
20 - medio de crecimiento de fibroblastos.

4. Composición de acuerdo con la reivindicación 3, *caracterizada* por que está constituida por:

- 25 - ácido hialurónico o una de sus sales como agente de viscosuplementación;  
- al menos otro polisacárido, de forma ventajosa de origen natural, e incluso de forma más ventajosa elegido  
entre el grupo: sulfato de condroitina, queratano, sulfato de queratano, heparina, celulosa y sus derivados,  
quitosano, xantanos, galactomanano, alginatos y sus respectivas sales; y  
- medio de crecimiento de fibroblastos.

5. Composición de acuerdo con una de las reivindicaciones precedentes, *caracterizada* por que se presenta en  
30 forma de un gel, de forma ventajosa un gel acuoso estéril.

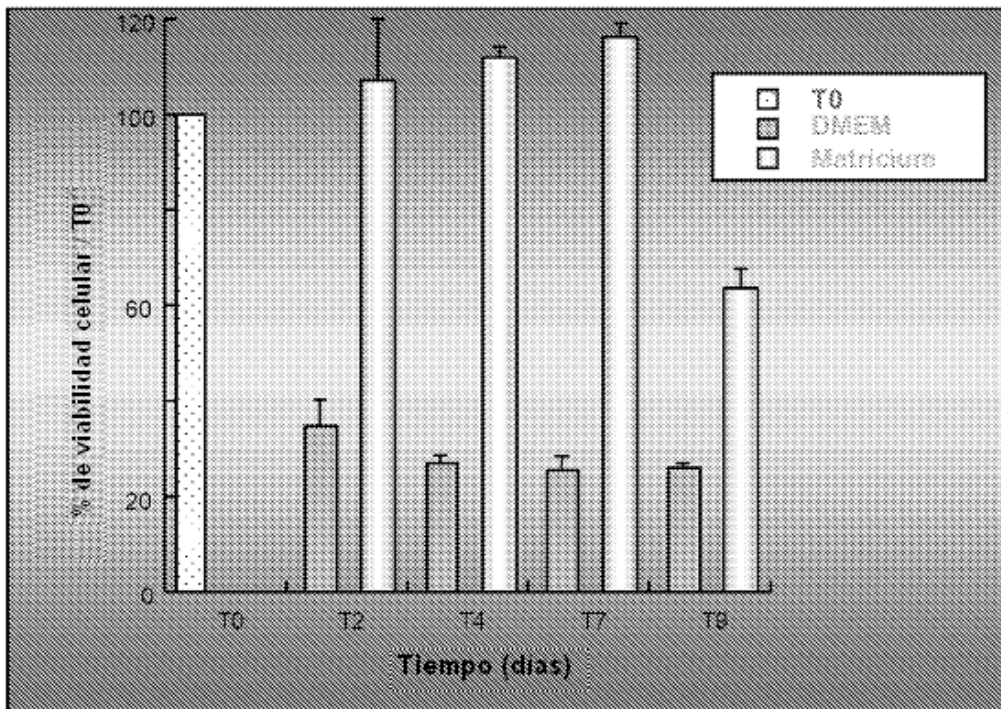
6. Composición de acuerdo con una de las reivindicaciones precedentes *caracterizada* por que el agente de  
viscosuplementación, de forma ventajosa ácido hialurónico, está presente en la composición a una concentración  
comprendida entre 1 y 100 mg/ml, de forma ventajosa comprendida entre 10 y 25 mg/ml.

35 7. Kit que se presenta en forma de jeringas y que contiene una composición de acuerdo con una de las  
reivindicaciones 1 a 6.

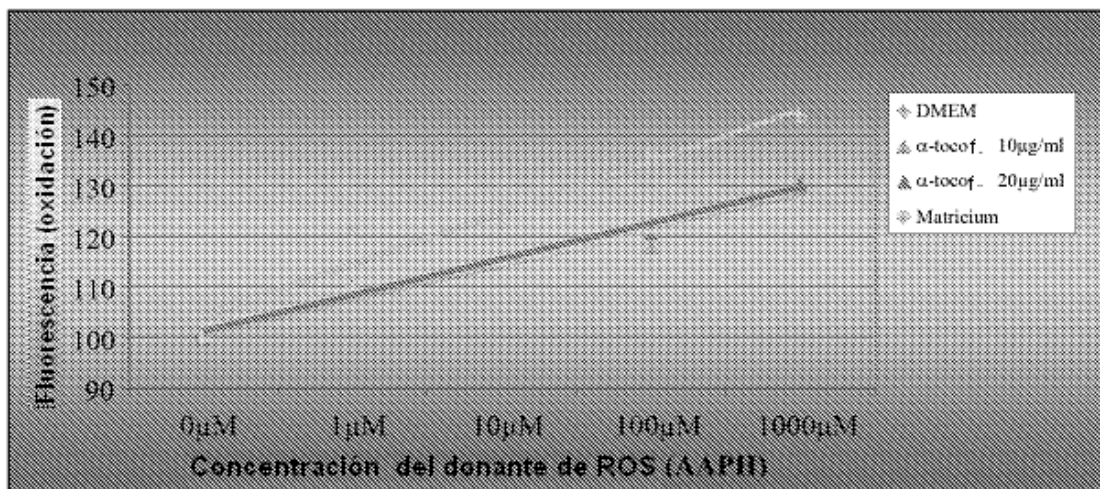
40 8. Dispositivo médico que comprende una composición de acuerdo con una de las reivindicaciones 1 a 6.

9. Composición de acuerdo con una de las reivindicaciones 1 a 6 o kit de acuerdo con la reivindicación 7 o  
dispositivo médico de acuerdo con la reivindicación 8 para utilización en el tratamiento de las degeneraciones de las  
articulaciones, en particular de la artrosis.

45 10. Productos que contienen un agente de viscosuplementación y un medio de crecimiento de fibroblastos tal como  
se han definido en una de las reivindicaciones 1 a 6 como producto de combinación para una utilización simultánea,  
separada o extendida en el tiempo, para el tratamiento de las degeneraciones de las articulaciones, en particular de  
la artrosis.



**Figura 1**



**Figura 2**