

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 746 075**

51 Int. Cl.:

A61K 31/19 (2006.01)

A61P 19/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **20.03.2015 PCT/EP2015/055991**

87 Fecha y número de publicación internacional: **24.09.2015 WO15140320**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **20.03.2015 E 15711510 (6)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **19.06.2019 EP 3119386**

54 Título: **Una composición para su uso en el tratamiento del dolor relacionado con los discos intervertebrales**

30 Prioridad:
20.03.2014 SE 1450320

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
04.03.2020

73 Titular/es:
**STAYBLE THERAPEUTICS AB (100.0%)
Medicinaregatan 8A
41390 Göteborg, SE**

72 Inventor/es:
OLMARKER, KJELL

74 Agente/Representante:
ISERN JARA, Jorge

Observaciones :

Véase nota informativa (Remarks, Remarques o Bemerkungen) en el folleto original publicado por la Oficina Europea de Patentes

ES 2 746 075 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

Una composición para su uso en el tratamiento del dolor relacionado con los discos intervertebrales

5 Campo técnico de la invención

La presente invención se refiere al dolor relacionado con los discos intervertebrales, tal como dolor lumbar, dolor lumbar crónico, dolor de cuello, dolor de cuello crónico y coxigodinia, y a una composición para su uso en el tratamiento del dolor relacionado con los discos intervertebrales.

10

Antecedentes

El dolor lumbar, por ejemplo, el dolor lumbar crónico, es una afección común que afecta a aproximadamente un 80 % de la población adulta durante su vida. El dolor lumbar no es una enfermedad específica con fisiopatología conocida, sino un síntoma con muchas causas. Se estima que una causa directa, como un tumor, una fractura o una infección, solo se conoce en aproximadamente un 5-10 % de los pacientes. En el 90-95 % restante de los casos, el dolor lumbar es idiopático, es decir, sin origen conocido.

15

La estructura de la espalda que parece ser la principal responsable de la producción del dolor lumbar es el disco intervertebral. Un disco intervertebral está colocado entre dos vértebras adyacentes. El disco intervertebral es por lo general flexible y permite el movimiento entre las vértebras adyacentes. Está formado por un anillo de tejido conectivo que comprende principalmente colágeno, y un centro semilíquido que comprende por ejemplo colágeno y proteoglicanos. El anillo se llama anillo fibroso y el centro se llama núcleo gelatinoso.

20

Ya a la edad de 20-30 años, el disco intervertebral de un ser humano comienza a experimentar el envejecimiento, un proceso a menudo denominado degeneración del disco. Durante el proceso de envejecimiento, el disco intervertebral se puede filtrar o herniar y producir síntomas como dolor lumbar y ciática. El envejecimiento del disco intervertebral por lo general termina a la edad de 60-80 años. En esta etapa, el disco intervertebral se ha transformado en tejido conectivo sólido y denso. Cuando esto ocurre, el disco intervertebral generalmente ya no producirá síntomas, ya que es menos probable que tenga fugas o se hernie. El envejecimiento del disco intervertebral implica además una reducción de la altura del disco y una reducción de la movilidad de la columna vertebral.

25

30

Se sabe que la degeneración del disco inducirá desgarros anulares que pueden permitir la comunicación entre el centro del disco intervertebral y la superficie externa del anillo fibroso. Por lo tanto, sustancias, como los agentes inflamatorios, desde el centro del disco intervertebral pueden filtrarse hacia la superficie externa del anillo fibroso. Los receptores, que generalmente son silenciosos y están dispuestos en la superficie externa del anillo fibroso, pueden ser activados por agentes inflamatorios típicamente presentes en el centro del disco intervertebral durante la degeneración del disco. Este mecanismo se sugiere como un mecanismo responsable del dolor lumbar.

35

40

Otro mecanismo que se ha sugerido que es responsable del dolor lumbar es que puede haber vasos sanguíneos y nervios recién formados que crecen desde la superficie externa del anillo fibroso hacia el centro del disco intervertebral a través de los desgarros anulares. Se supone que estos nervios pueden producir dolor cuando el disco intervertebral se mueve y ejerce presión sobre los nervios.

45

Un procedimiento común para tratar el dolor lumbar es mediante la estabilización quirúrgica de un segmento vertebral que comprende un disco intervertebral, disco intervertebral que supuestamente produce dolor. La razón es reducir los movimientos del disco intervertebral que produce dolor para evitar que los nervios congénitos se compriman y produzcan dolor. Sin embargo, este tratamiento quirúrgico es invasivo y no del todo satisfactorio.

50

Otro procedimiento propuesto para tratar el dolor lumbar, o más bien la ciática, es mediante la llamada quimionucleólisis, en la que se inyecta una enzima en un disco intervertebral para disolver el núcleo gelatinoso, reduciendo de ese modo la presión ejercida por el núcleo gelatinoso del disco intervertebral, por ejemplo, en un nervio.

55

Además, otro procedimiento propuesto para tratar el dolor lumbar es mediante rejuvenecimiento o regeneración del disco intervertebral mediante la introducción de, por ejemplo, células de disco cultivadas y células madre. Sin embargo, parece poco probable que el ambiente privado de nutrientes en el centro del disco intervertebral asegure con éxito la supervivencia de las células recién introducidas.

60

Por ejemplo, la regeneración estimulada por un agente fibrosante se ha desvelado en el documento WO 2005/046746. El documento WO 2005/046746 se refiere, por ejemplo, a un método que comprende introducir en un espacio intervertebral del disco de un paciente que lo necesite, una cantidad terapéuticamente eficaz de un agente fibrosante o una composición que comprende un agente fibrosante. El agente fibrosante induce una respuesta fibrótica en el espacio intervertebral del disco del paciente, proporcionando de ese modo al paciente un resultado beneficioso. El documento WO 2005/046746 también se refiere a una composición inyectable que comprende un

65

agente fibrosante y un agente de carga.

Sin embargo, todavía existe la necesidad en la técnica de proporcionar un procedimiento seguro y satisfactorio para tratar con más éxito el dolor lumbar.

5

Sumario de la invención

El objeto de la presente invención es proporcionar una composición para su uso en el tratamiento del dolor relacionado con los discos intervertebrales, tal como dolor lumbar, dolor lumbar crónico, dolor de cuello, dolor de cuello crónico y coxigodinia.

10

La composición para su uso en el tratamiento del dolor relacionado con los discos intervertebrales se puede formular de un modo tal que se puede administrar en una cantidad terapéuticamente eficaz mediante una inyección local a un disco intervertebral.

15

El concepto de la presente invención es reducir el dolor relacionado con los discos intervertebrales mediante la aceleración del envejecimiento de un disco intervertebral haciendo de ese modo que el disco intervertebral sea más rígido, por ejemplo, mediante transformación del disco intervertebral en tejido conectivo sólido y denso. La transformación de un disco intervertebral en tejido conectivo sólido y denso hace que sea más estable, y por lo tanto, el disco intervertebral obtiene una gama de movimiento reducido. Un disco intervertebral transformado en tejido conectivo sólido y denso no permitirá que ningún componente fluido se fugue del espacio del disco, por ejemplo, en la superficie externa del anillo fibroso, ni permitirá que los nervios crezcan en el disco intervertebral.

20

Ya en 1959, Carl Hirsch afirmó que: "Tarde o temprano se puede encontrar una sustancia mediante la cual un disco degenerado se pueda transformar en tejido conectivo denso". En el artículo "Studies on the Pathology of Low Back Pain" publicado en The Journal of Bone and Joint Surgery, Vol. 41B, N.º 2, p. 237-243, mayo de 1959. Sin embargo, parece que hasta ahora nadie ha presentado una sustancia de ese tipo.

25

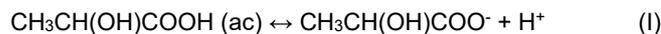
El inventor de la presente invención ha encontrado de forma sorprendente que la sustancia con éxito podría ser ácido láctico, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo. Este hallazgo es particularmente sorprendente en vista de la técnica anterior, en lugar de centrarse en la disminución de la cantidad de ácido láctico, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, dentro de un disco intervertebral que causa dolor. Por ejemplo, el documento US 2012/0022425 A1 desvela un método para reducir el ácido láctico dentro de un disco intervertebral al inyectar un inhibidor de ácido láctico en el disco vertebral para inhibir la producción de ácido láctico, y de ese modo aliviar el dolor de espalda por consumo de ácido láctico. Además, el documento WO 2013/092753 A1 desvela un compuesto de derivados de indol para inhibir la producción de lactato en el tratamiento de, por ejemplo, dolor de espalda crónico.

30

35

El ácido láctico es un ácido carboxílico con la fórmula química $\text{CH}_3\text{CH}(\text{OH})\text{COOH}$. Como se muestra en la fórmula (I) que sigue a continuación, el ácido láctico puede perder, en una solución acuosa, un protón de su grupo carboxilo, produciendo el ion lactato $\text{CH}_3\text{CH}(\text{OH})\text{COO}^-$. La fracción molar de ácido láctico con respecto a ion lactato es 1:1.

40



El ion lactato puede, junto con un contraión, formar una sal farmacéuticamente aceptable. El contraión puede ser un ion metálico seleccionado entre el grupo que consiste en los iones de los siguientes elementos: Li, Be, Na, Mg, K, y Ca. De forma alternativa, el contraión puede ser un ion orgánico, tal como amonio o colina. El ácido láctico, o sales farmacéuticamente aceptables del mismo, están presentes de forma natural en el cuerpo humano.

45

Se ha medido que la concentración de iones lactato en el agua tisular de un disco intervertebral lumbar de un paciente con dolor de espalda tiene está dentro del intervalo de 1 mmol/l a aproximadamente 12 mmol/l, por lo general en el intervalo de 2 mmol/l a 6 mmol/l. Estos valores medidos se han presentado en la página 5 y en la Figura 6 del artículo científico "Oxygen and lactate concentrations measured in vivo in the intervertebral discs of patients with scoliosis and back pain" de Bartels *et al.*, publicado en Spine 23(1): pp. 1-8, 1998.

50

Se ha medido que la concentración de iones lactato en el agua tisular de un disco intervertebral lumbar de un paciente con dolor de espalda tiene está dentro del intervalo de ion lactato por litro de agua tisular en el disco intervertebral lumbar corresponde a una concentración de masa de 89,07 mg/l. Del mismo modo, una concentración molar de 12 mmol de ion lactato por litro de agua tisular en el disco corresponde a una concentración de masa de 1067 mg/l.

60

En un ser humano, el espacio del disco de un disco intervertebral lumbar tiene un volumen que se estima que es de aproximadamente 1,5 ml a 3,0 ml.

En vista de lo mencionado anteriormente, la persona con experiencia en la materia podría calcular fácilmente la cantidad de lactato, expresada en moles o gramos, en el disco. Un ejemplo se proporciona en la Tabla 1.

65

Tabla 1. Cantidades aproximadas de ion lactato en un disco intervertebral lumbar de un paciente con dolor de espalda.

Concentración de ion lactato observada en el agua tisular del disco lumbar (L3-L4) de un paciente con dolor de espalda	1 - 12 mmol/l
Volumen medio del espacio del disco de un disco lumbar que comprende el agua tisular	1,5 - 3 ml
Moles de ion lactato calculados en el agua tisular	0,0015 - 0,036 mmol
Peso molar del ion lactato	89,07 g/mol
Masa calculada de ion lactato en el agua tisular	0,134 - 3,21 mg

- 5 El ácido láctico, el ión lactato o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo pueden interferir de forma negativa con la función de las células del disco intervertebral, en particular las células que producen los proteoglicanos necesarios para prevenir el envejecimiento del disco.
- 10 El envejecimiento de un disco intervertebral se inicia por un suministro reducido de nutrientes y oxígeno a través de la difusión desde los vasos sanguíneos en las vértebras adyacentes y desde las estructuras circundantes. Esto inducirá gradualmente una acumulación de productos de desecho metabólico en el disco intervertebral, tal como en el núcleo gelatinoso. Un tipo de producto de desecho metabólico que puede estar presente es el ácido láctico y sus sales farmacéuticamente aceptables.
- 15 El ácido láctico, y las sales farmacéuticamente aceptables del mismo, pueden contribuir a varios mecanismos que provocarán la muerte celular en los discos intervertebrales, tal como acumulación de grasa intracelular, hinchazón mitocondrial, acumulación de cromatina y liberación de glutamato excitotóxico.
- 20 El ácido láctico, y las sales farmacéuticamente aceptables del mismo, pueden liberar PGE₂ causando inflamación y producción de tejido conectivo. Además, el ácido láctico, y las sales farmacéuticamente aceptables del mismo, pueden estimular la liberación de TGF-beta, que a su vez estimula la producción de colágeno por los fibroblastos.
- 25 El ácido láctico, y las sales farmacéuticamente aceptables del mismo, también pueden contribuir a la coagulación intravascular diseminada y a la coagulopatía de consumo, lo que aumenta la tendencia de los glóbulos rojos a acumularse, formando "lodo sanguíneo" y hace que los glóbulos rojos sean más rígidos, a su vez, aumentando la viscosidad de la sangre y la circulación deficiente en los pequeños vasos.
- 30 Por lo tanto, un aumento de la concentración de ácido láctico, o las sales farmacéuticamente aceptables del mismo, en un disco intervertebral por administración de una composición que comprende ácido láctico, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, en el espacio del disco del disco intervertebral podría ser por lo tanto acelerar el envejecimiento del disco e inducir la transformación del núcleo gelatinoso en tejido conectivo.
- 35 El envejecimiento del disco intervertebral, incluyendo la transformación del núcleo gelatinoso en tejido conectivo, hace que el disco intervertebral se vuelva más rígido, y al administrar una composición que comprende ácido láctico, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, el envejecimiento se puede acelerar de manera controlable. Por lo general, la concentración de ácido láctico, o las sales farmacéuticamente aceptables del mismo, se puede aumentar en un disco intervertebral, más específicamente en el espacio del disco, con el fin de acelerar el envejecimiento.
- 40 El inventor ha descubierto que una composición que comprende ácido láctico, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, induce una transformación del disco intervertebral notable, haciéndolo más rígido. La transformación notable se ha interpretado como un envejecimiento acelerado del disco intervertebral por la transformación del núcleo gelatinoso en tejido conectivo. Por lo tanto, el inventor espera mejoras para un paciente con respecto al dolor relacionado con los discos intervertebrales si una composición que comprende ácido láctico, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, se administra en el núcleo gelatinoso del disco intervertebral dando como resultado una mayor concentración de ácido láctico, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, dentro del espacio del disco.
- 45 El inventor espera mejoras para un paciente con respecto al dolor relacionado con los discos intervertebrales, tal como dolor de cuello, dolor lumbar o coxigodinia, después de la administración de ácido láctico, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, o una composición que comprende ácido láctico, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, en un espacio del disco de un disco intervertebral siendo, al menos en parte, responsable del dolor relacionado con los discos intervertebrales.
- 50 De acuerdo con un primer aspecto de la invención, se proporciona una composición para su uso en el tratamiento
- 55

del dolor relacionado con los discos intervertebrales. La composición comprende ácido láctico, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo. La composición se administra en un espacio del disco que comprende el núcleo gelatinoso de un disco intervertebral.

5 La composición para su uso en el tratamiento del dolor relacionado con los discos intervertebrales puede comprender al menos uno de ácido láctico y una sal farmacéuticamente aceptable del mismo. La sal farmacéuticamente aceptable es una sal farmacéuticamente aceptable que comprende un ion lactato y un contraión.

10 Las ventajas de la composición para su uso en el tratamiento del dolor relacionado con los discos intervertebrales de acuerdo con la presente invención es un tratamiento más seguro y más eficaz del dolor relacionado con los discos intervertebrales, además de ser menos costoso y menos invasivo que los tratamientos, por ejemplo, tratamiento quirúrgico, conocido en el estado de la técnica. Además, el ácido láctico, o las sales farmacéuticamente aceptables del mismo, son biocompatibles. El cuerpo de un vertebrado, como un ser humano, es capaz de manipulación, tal como degradación, de ácido láctico o las sales farmacéuticamente aceptables del mismo, ya que estos compuestos son compuestos naturales, tal como productos de desecho, presentes en el cuerpo del vertebrado.

15 El inventor sugiere que el núcleo gelatinoso en el espacio del disco de un disco intervertebral se puede transformar en tejido conectivo sólido y denso, similar al tejido conectivo del anillo fibroso, cuando una composición para su uso en el tratamiento del dolor relacionado con los discos intervertebrales de acuerdo con la presente invención se administra en el núcleo gelatinoso. Por ejemplo, también, la coagulación de la sangre se puede producir durante la transformación del núcleo gelatinoso en tejido conectivo, lo que hace que el disco intervertebral sea aún más sólido y denso. Se espera que el aumento de la rigidez disminuya el dolor.

20 De acuerdo con una realización, la composición para su uso se administra en una cantidad eficaz para aumentar la concentración de ácido láctico, o la concentración de iones lactato de la sal farmacéuticamente aceptable, en espacio del disco hasta más de 12 mmol/l.

25 La composición para su uso se puede administrar en una cantidad eficaz para aumentar la concentración de ácido láctico o ion lactato en el espacio del disco hasta una concentración mayor que la concentración que se produce durante el envejecimiento natural.

30 De acuerdo con una realización, la composición para su uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 2, en el que la concentración de ácido láctico, o la concentración de iones lactato de la sal farmacéuticamente aceptable, en la composición es al menos 12 mmol/l, por ejemplo dentro del intervalo de 12 a 12000 mmol/l, tal como de 100 a 10000 mmol/l, tal como de 500 a 5000 mmol/l, tal como de 800 a 2000 mmol/l.

35 De acuerdo con una realización, la sal farmacéuticamente aceptable es un lactato de cualquiera de los elementos seleccionados entre el grupo que consiste en: los metales alcalinos y los metales alcalinotérreos. Por ejemplo, la sal farmacéuticamente aceptable es al menos una de lactato de litio, lactato de sodio, lactato de potasio, lactato de berilio, lactato de magnesio y lactato de calcio.

40 De acuerdo con una realización, la sal farmacéuticamente aceptable se selecciona entre el grupo que consiste en: lactato de amonio, lactato de colina, lactato de litio, lactato de sodio, lactato de potasio, lactato de berilio, lactato de magnesio y lactato de calcio.

45 De acuerdo con una realización, la composición para su uso se administra al espacio del disco de un disco intervertebral que contribuye al dolor relacionado con los discos intervertebrales.

50 En un ejemplo, la composición para su uso se puede administrar a cualquiera o todos los discos intervertebrales que se sospecha que contribuyen al dolor relacionado con los discos intervertebrales.

De acuerdo con una realización, ácido láctico o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, se administra mediante inyección local en el espacio del disco que comprende el núcleo gelatinoso.

55 La inyección local por lo general se puede llevar a cabo con una jeringa.

De acuerdo con una realización, el ácido láctico se administra en una dosificación única dentro del intervalo de 2 mg a 200 mg, tal como de 5 mg a 200 mg, tal como de 10 a 100 mg, tal como de 10 a 50 mg, tal como de 15 a 30 mg. La dosificación única corresponde a la cantidad de ácido láctico que se va a administrar por espacio del disco.

60 Si se administra una sal farmacéuticamente aceptable, el ion lactato de la sal farmacéuticamente aceptable se administran una cantidad que corresponde a la dosificación única de ácido láctico que se ha mencionado anteriormente, teniendo en cuenta la fracción molar de ácido láctico con respecto a ion lactato.

65 De acuerdo con una realización, la composición para su uso que comprende ácido láctico, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, se administra en una sola ocasión en la dosificación única.

De acuerdo con una realización, la composición está en forma de una solución acuosa que comprende dicho ácido láctico o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.

5 Por lo general, la composición para su uso en el tratamiento del dolor relacionado con los discos intervertebrales se proporciona en un estado líquido adecuado para la inyección local.

De acuerdo con una realización, el dolor relacionado con los discos intervertebrales se selecciona entre dolor de cuello, dolor de cuello crónico, dolor lumbar, dolor lumbar crónico, y coxigodinia.

10 En algunos ejemplos, la composición puede comprender además al menos un agente seleccionado entre agentes solubilizantes, estabilizantes, tampones, modificadas de tonicidad, agentes de formación de volumen, potenciadores la viscosidad, reductores de la viscosidad, tensioactivos, agentes de enmascaramiento, conservantes y adyuvantes.

15 En un ejemplo alternativo, un derivado del ácido láctico se puede administrar además como alternativa como un profármaco, tal como lactato de etilo.

En un ser humano, la cantidad de la composición que se va a administrar puede estar dentro del intervalo de 0,05 ml a 5 ml, tal como de 0,1 a 3 ml, por ejemplo, de 0,2 ml a 2 ml. Estas cantidades corresponden más o menos al volumen del núcleo gelatinoso en un ser humano. Para un disco intervertebral lumbar, la cantidad de la composición que se va a administrar puede ser aproximadamente de 1,5 ml a 3,0 ml. Para un disco intervertebral cervical, la cantidad de la composición que se va a administrar puede ser de aproximadamente 0,5 ml. Para un disco intervertebral coxígeo, la cantidad de la composición que se va a administrar puede ser de aproximadamente 0,2 ml.

20 En el presente documento con el término "ocasión única" se hace referencia a una sola visita a un consultorio médico, como durante una visita al médico, por ejemplo, en el hospital. La visita no puede durar más de 24 horas, tal como de 0,5 a 5 horas. El término por lo general, pero no necesariamente, implica que la dosis única se administra mediante una sola inyección en una sola ocasión. Sin embargo, el término también cubre los casos en los que la dosificación única se administra en una sola ocasión, pero mediante varias inyecciones, tal como de 2 a 10 inyecciones por ocasión única, por ejemplo, de 2 a 5 inyecciones por ocasión única.

En el presente documento con el término "ocasiones repetidas" se hace referencia a más de una visita, es decir, una pluralidad de visitas, en un consultorio médico, como durante más de una visita al médico, por ejemplo, en el hospital. Cada visita no puede durar más de 24 horas, tal como de 0,5 a 5 horas. El término por lo general, pero no necesariamente, implica que la dosificación única se administra mediante una sola inyección pero en ocasiones repetidas. Sin embargo, el término también cubre casos en los que la dosificación única se administra en repetidas ocasiones, pero mediante varias inyecciones, tal como de 2 a 10 inyecciones por cada una de dichas ocasiones repetidas, por ejemplo, de 2 a 5 inyecciones por cada una de dichas ocasiones repetidas.

40 Con el término "disco intervertebral" se hace referencia a un elemento que se encuentra entre dos vértebras adyacentes en la columna vertebral. Cada disco intervertebral forma una articulación cartilaginosa para permitir un ligero movimiento de las vértebras, y actúa como un ligamento para mantener las vértebras juntas. Un disco intervertebral consiste en un anillo fibroso externo, que rodea un núcleo gelatinoso interno. Una columna vertebral humana comprende 23 discos intervertebrales: 6 en el cuello (región cervical), 12 en la parte media de la espalda (región torácica) y 5 en la parte inferior de la espalda (región lumbar). Además, los discos intervertebrales también están colocados entre los huesos coxígeos. Un disco intervertebral también se puede llamar disco.

50 Con el término "núcleo gelatinoso" se hace referencia a la sustancia gelatinosa en la parte media de un disco intervertebral. El núcleo gelatinoso comprende células similares a los condrocitos, fibrillas de colágeno y agregados de proteoglicanos que se añaden a través de cadenas hialurónicas. Unidas a cada molécula de agregano se encuentran las cadenas de glicosaminoglicano (GAG) de sulfato de condroitina y sulfato de queratano. El núcleo gelatinoso actúa como un amortiguador y mantiene separadas las dos vértebras adyacentes.

55 Con el término "anillo fibroso" se hace referencia a una lámina de tejido fibroso y fibrocartilago formado en la circunferencia del núcleo gelatinoso. El anillo fibroso anular sirve para distribuir la presión de manera uniforme a través del disco intervertebral.

60 Con el término "espacio del disco" se hace referencia al espacio de un disco intervertebral que está relleno por el núcleo gelatinoso y que tiene una circunferencia definida por el anillo fibroso.

Con el término "placa terminal craneal" se hace referencia a la superficie de un disco intervertebral orientado hacia el cráneo. La placa terminal craneal está colocada en el lado opuesto del disco intervertebral en comparación con la placa terminal caudal.

65 Con el término "placa terminal caudal" se hace referencia a la superficie de un disco intervertebral que se aleja del cráneo. La placa terminal caudal está colocada en el lado opuesto del disco intervertebral en comparación con la

placa terminal craneal.

Con el término "articulación facetaria" se hace referencia a una estructura articular emparejada que por lo general tiene una superficie articular que está cubierta con cartílago articular. La articulación facetaria generalmente está encerrada por una cápsula. La articulación facetaria forma una articulación entre el proceso articular inferior de las vértebras y el proceso articular superior de las vértebras. Una articulación facetaria se construye por lo general para permitir el movimiento y proporcionar soporte mecánico a la columna vertebral.

Con el término "proceso transverso" se hace referencia a una formación ósea que se extiende lateralmente desde el arco vertebral en ambos lados. También se denomina proceso costal.

Con el término "dolor relacionado con los discos intervertebrales" en el presente documento se hace referencia a un dolor relacionado con un disco intervertebral que produce dolor. El dolor relacionado con el disco intervertebral puede ser dolor relacionado con al menos una de una vértebra cervical (C), una vértebra lumbar (L), una vértebra sacra (S) y una vértebra coxígea (Co). Los ejemplos del dolor relacionado con los discos intervertebrales pueden ser dolor lumbar, dolor lumbar crónico, dolor de cuello, dolor de cuello crónico y coxigodinia.

Con el término "dolor lumbar crónico" se hace referencia a dolor lumbar en el que los síntomas se han producido durante más de 12 semanas.

Con el término "dolor de cuello crónico" se hace referencia a dolor de cuello en el que los síntomas se han producido durante más de 12 semanas.

Con el término "coxigodinia" se hace referencia a dolor en el área del coxis o vértebra caudal.

Con el término "rigidez durante la flexión" se hace referencia en el presente documento a una característica que describe la rigidez de un disco intervertebral colocado en un segmento de una columna vertebral. La rigidez durante la flexión se puede determinar aplicando una fuerza en el segmento de una columna vertebral hasta que alcance un modo de flexión lateral completa y, a partir de entonces, midiendo la distancia entre los procesos transversales de las vértebras que se disponen en los dos lados opuestos del disco intervertebral, respectivamente. El modo de flexión lateral completa se define como el estado en el que el disco intervertebral del segmento de la columna vertebral no se puede forzar aún más sin romper el segmento de la columna vertebral. Esta característica se mide en milímetros. La rigidez durante la flexión es una forma de caracterizar la rigidez durante la flexión del segmento de la columna vertebral y, más específicamente, la rigidez durante la flexión del disco intervertebral.

La rigidez flexural se define generalmente como el par de fuerzas requerido para doblar una estructura no rígida a una curvatura unitaria. Es una medida de la rigidez de un miembro estructural; el producto del módulo de elasticidad y momento de inercia dividido entre la longitud del miembro. En otras palabras, es la relación de la tensión con respecto a la deformación en un material elástico cuando ese material se dobla.

De acuerdo con un segundo aspecto, se proporciona un método para el tratamiento del dolor relacionado con los discos intervertebrales mediante la administración de una cantidad terapéuticamente eficaz de ácido láctico, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, en el núcleo gelatinoso de un disco intervertebral de un paciente con necesidad del mismo. Los efectos y características de este segundo aspecto de la presente invención son análogos a los que se han descrito anteriormente en relación con el primer aspecto de la presente invención.

De acuerdo con un tercer aspecto, se proporciona el uso de ácido láctico, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo en la fabricación de medicamento para el tratamiento del dolor relacionado con los discos intervertebrales. Los efectos y características de este tercer aspecto de la presente invención son análogos a los que se han descrito anteriormente en relación con los aspectos previos de la presente invención.

De acuerdo con un cuarto aspecto, se proporciona ácido láctico, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo para su uso en el tratamiento del dolor relacionado con los discos intervertebrales. Los efectos y características de este cuarto aspecto de la presente invención son análogos a los que se han descrito anteriormente en relación con los aspectos previos de la presente invención.

Otras características y ventajas de la presente invención serán evidentes al estudiar las reivindicaciones adjuntas y la siguiente descripción. La persona con experiencia se da cuenta de que se pueden combinar diferentes características de la presente invención para crear realizaciones distintas de las descritas a continuación, sin apartarse del alcance de la presente invención.

Breve descripción de las figuras

Estos y otros aspectos de la presente invención se describirán ahora con más detalle, con referencia a las figuras adjuntas que muestran las realizaciones de la invención.

En la Fig. 1, se muestra esquemáticamente una sección transversal de una columna vertebral de un ser humano.

En la Fig. 2, dos vértebras adyacentes de una columna vertebral humana se muestran esquemáticamente en una vista lateral.

En la Fig. 3, una parte inferior de una columna vertebral de un humano se muestra esquemáticamente en una vista lateral.

5 En la Fig. 4, un segmento vertebral se muestra esquemáticamente en una vista posterior.

En la Fig. 5, se muestra esquemáticamente cómo se mide la longitud antero-posterior de una sección transversal de un disco intervertebral.

En la Fig. 6, se muestra esquemáticamente cómo se mide el ancho bilateral de una sección transversal de un disco intervertebral.

10 La Fig. 7 muestra tres discos intervertebrales en sección transversal, y la transformación del núcleo gelatinoso en tejido conectivo en el disco a que se le administra una composición de acuerdo con una realización de la presente invención.

La Fig. 8 muestra los resultados experimentales del estudio de la producción de colágeno en fibroblastos tras el tratamiento con ácido láctico.

15 La Fig. 9 muestra los resultados experimentales del estudio de la producción de colágeno en células del núcleo gelatinoso tras el tratamiento con ácido láctico.

Como se ilustra en las figuras, los tamaños de las capas y regiones se exageran con fines ilustrativos y, por lo tanto, se proporcionan para ilustrar las estructuras generales de las realizaciones de la presente invención. Los números de referencia iguales se refieren a elementos similares en todas partes.

20

Descripción detallada de la invención

A medida que un vertebrado envejece, sus discos intervertebrales experimentan una transformación. Un efecto de la transformación es que el núcleo gelatinoso comienza a deshidratarse y la concentración de proteoglicanos en la matriz disminuye, lo que resulta en una disminución del tamaño del disco intervertebral. Otro efecto es que el anillo fibroso se debilita y aumenta el riesgo de desgarro. Los efectos de la transformación del disco intervertebral pueden causar dolor relacionado con los discos intervertebrales, por ejemplo, dolor de cuello, dolor lumbar o coxigodinia, en el estado anterior al disco intervertebral se vuelve suficientemente sólido y denso.

25

Una columna vertebral de un vertebrado comprende vértebras, que rodean y protegen una médula espinal. En los seres humanos, la columna vertebral está situada en la cara dorsal del torso. Entre dos vértebras adyacentes, se dispone un disco intermedio intervertebral, es decir, las vértebras se alternan por discos intervertebrales que forman la columna vertebral. La estructura específica y otras partes de la columna vertebral son conocidas por una persona con experiencia en la materia.

30

La Fig. 1 muestra esquemáticamente una sección transversal de una columna vertebral 100 de un ser humano. Adyacente a un cuerpo vertebral 15 de una vértebra, se dispone un disco intervertebral que comprende un anillo fibroso 10 y un núcleo gelatinoso 11. El núcleo gelatinoso 11 llena el llamado espacio del disco del disco intervertebral. El anillo fibroso 10 rodea el núcleo gelatinoso 11 y define el borde del núcleo gelatinoso, así como del espacio del disco.

40

Una médula espinal 17 está situada en el centro de la columna vertebral, y adyacente al disco intervertebral. Los nervios espinales 16, 16', se extienden desde la médula espinal 17 hacia lados opuestos y muy cerca del disco intervertebral.

45

Una articulación facetaria 14, 14', está situada entre un proceso articular inferior 13, 13' y un proceso articular superior 12, 12'. En lados opuestos de la médula espinal 17, se disponen dos articulaciones facetarias 14, 14', respectivamente. Las articulaciones facetarias 14, 14', están dispuestas en aproximadamente la misma sección transversal y plano.

50

La Fig. 2 muestra esquemáticamente un segmento de una columna vertebral 200 que comprende dos vértebras adyacentes 20, 22. Una primera vértebra 22 y una segunda vértebra 20 están dispuestas en lados opuestos de un disco intervertebral 21. La primera vértebra 22 está dispuesta relativamente más cerca del tórax, y la segunda vértebra 20 está dispuesta relativamente más cerca del sacro. La placa terminal caudal 23 de la primera vértebra 22 y la placa terminal craneal 25 de la segunda vértebra 20 se muestran en la figura 2. La placa terminal craneal 25 y la placa terminal caudal 23 están enfrentadas a lados opuestos del disco intervertebral 21.

55

La Fig. 2 también muestra esquemáticamente cómo está dispuesta una articulación facetaria 24 entre el proceso articular inferior de la primera vértebra 22 y el proceso articular superior de la segunda vértebra 20. Un proceso transversal 26 se extiende lateralmente desde el arco vertebral.

60

La Fig. 3 muestra esquemáticamente una parte inferior de una columna vertebral 300. Las vértebras coxígeas 36 de la columna vertebral están dispuestas en una porción extrema de la parte inferior de la columna vertebral 300. El sacro 39 de la columna vertebral está dispuesto adyacente a las vértebras coxígeas 36, más cerca del tórax que las vértebras coxígeas 36. Una quinta vértebra lumbar, en el presente documento llamada L5, 30 está dispuesta

65

adyacente al sacro 39, más cerca del tórax que el sacro 39. En una dirección desde el sacro 39 hacia el tórax, varias vértebras están dispuestas en una fila que comienza con L5, 30. Adyacente a la quinta vértebra lumbar 30, es decir, L5, las siguientes vértebras están ordenadas en orden: una cuarta vértebra lumbar 32, es decir, L4, una tercera vértebra lumbar, es decir, L3, un segunda vértebra lumbar, es decir, L2, y una primera vértebra lumbar 38, es decir, L1; La primera vértebra lumbar está dispuesta relativamente más cerca del tórax. Entre cada dos vértebras adyacentes, se dispone un disco intermedio 31. Los discos intervertebrales (no mostrados) también están imponiendo las vértebras coxígeas 36.

Ejemplos

El procedimiento para inducir y evaluar la transformación acelerada del núcleo gelatinoso en tejido conectivo en un disco intervertebral en un cerdo mediante la administración de una composición para su uso en el tratamiento del dolor relacionado con el disco intervertebral que comprende ácido láctico, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, se describirá en lo sucesivo en el presente documento de forma más detallada.

En el presente ejemplo, una composición para su uso en el tratamiento del dolor relacionado con los discos intervertebrales que comprende ácido láctico, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, se administra en el núcleo gelatinoso de un disco intervertebral dispuesto entre la tercera vértebra lumbar L3 y la cuarta vértebra lumbar L4. Una persona con experiencia en la materia podría comprender fácilmente que el mismo procedimiento se puede aplicar a cualquier disco intervertebral en una columna vertebral.

Por lo tanto, las etapas del procedimiento son las siguientes:

100. preparar una composición que comprende ácido láctico, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo;
101. anestesiarse a un cerdo que comprende una columna vertebral que comprende el disco intervertebral que comprende el núcleo gelatinoso en el que se administrará la composición;
102. permitir el acceso al disco intervertebral a través de una incisión lateral entre la costilla más baja y la cresta ilíaca del cerdo;
103. hacer incisión en el disco intervertebral;
104. administrar, en el presente documento mediante inyección local, la composición en el núcleo gelatinoso mediante una aguja de inyección;
105. permitir que el cerdo se mueva libremente durante siete días después de recuperarse de la anestesia;
106. recoger la columna lumbar en bloque, comprendiendo el segmento recogido los cuerpos vertebrales y el disco intervertebral que comprende el núcleo gelatinoso sometido a inyección, pero sin los elementos posteriores (el arco vertebral y las articulaciones facetarias);
107. medir la distancia entre los procesos transversales a los niveles de los discos L 2-3, L 3-4, L4-5 sin ninguna fuerza externa aplicada;
108. aplicar una fuerza externa al segmento de la columna vertebral hasta que se consiga un modo de flexión lateral completa para la muestra de columna lumbar;
109. medir la distancia entre los procesos transversales a los niveles de los discos L 2-3, L 3-4, L4-5 bajo flexión lateral completa;
110. realizar una sección transversal de los discos y medir la longitud (dirección anteroposterior) y el ancho (dirección bilateral) del espacio del disco.

Ejemplo 1: Preparación de una composición que comprende ácido láctico

Una solución de ácido láctico puro se adquirió en Sigma Aldrich (número de producto: 69775 Fluka; número CAS: 50-21-5, Estocolmo, Suecia). Como se muestra en la Tabla 2, el peso molecular del ácido láctico es 90,08 g/mol y la densidad de la solución pura de Sigma Aldrich era 1,209 g/ml, respectivamente.

Por lo tanto se calculó que la concentración de ácido láctico en la solución pura de Sigma Aldrich era 0,0134 mol/ml, lo que es igual a 13,4 mol/l.

La solución de ácido láctico puro se diluyó a partir de ese momento 10 veces usando agua destilada a temperatura ambiente. De forma más explícita, 1 ml de la solución de ácido láctico puro de Sigma Aldrich se diluyó con 9 ml de agua destilada. Por lo tanto la concentración resultante de ácido láctico en la composición preparada fue de 1,34 mol/ml.

Tabla 2. Cantidades de ácido láctico en la composición preparada.

Densidad del ácido láctico en la solución de ácido láctico puro	1,209 g/ml
Peso molar del ácido láctico	90,08 g/mol

(continuación)

Concentración calculada de ácido láctico en la solución de ácido láctico puro	13,4 mol/l
Grado de dilución	10 %
Concentración calculada de ácido láctico en la solución de ácido láctico puro	1,34 mol/l

Ejemplo 2: Administración de una composición que comprende ácido láctico al núcleo gelatinoso de un disco intervertebral en un cerdo mediante inyección local

5 Dos cerdos fueron anestesiados y colocados sobre su lado derecho. El acceso al disco intervertebral L4-5 se obtuvo a través de una incisión lateral entre la costilla más baja y la cresta ilíaca en el lado izquierdo de cada cerdo. A partir de ese momento, se hizo una incisión en el disco intervertebral L3-4 con un bisturí.

10 La composición que comprende ácido láctico se inyectó con una jeringa en el núcleo gelatinoso del disco intervertebral L3-4. La composición que comprende ácido láctico en una concentración total de 1,34 mol/l se inyectó en una cantidad de aproximadamente 0,2 ml en el núcleo gelatinoso, como se muestra en la Tabla 3. La composición se inyectó en una sola etapa en una ocasión única.

15 Pareció que ambos cerdos toleraron bien el procedimiento y no se observaron reacciones adversas tales como disminución de la movilidad o vocalización durante el periodo de siete días hasta la recogida. En la recogida, los cerdos se sacrificaron.

Tabla 3. Cantidad de ácido láctico en la composición administrada a un disco intervertebral L3-4 de un cerdo.

Volumen de solución de ácido láctico puro diluido inyectado	0,2 ml
Moles calculados de ácido láctico en la inyección	0,268 mmol
Masa calculada de ácido láctico en la inyección	23,9 mg

20 Ejemplo 3: Evaluación de la transformación del núcleo gelatinoso en tejido conectivo en un disco intervertebral al que se administra una composición que comprende ácido láctico

25 El sitio de inyección se observó a simple vista. No se observó reacción adversa en el sitio de inyección, tal como hemorragias, inflamación o necrosis, en ninguno de los cerdos. Se eliminó el segmento de la columna vertebral que se extiende desde la vértebra lumbar L2 hasta la vértebra sacra S1. Se eliminaron las articulaciones facetarias, lo que permitió una total flexibilidad de los discos sin restricciones de otras estructuras.

30 3a - Rigidez durante la flexión del disco intervertebral antes y después de la administración de la composición, respectivamente

En la Fig. 4, se muestra un segmento de una columna vertebral que comprende discos intervertebrales 21, en particular, los discos intervertebrales L2-3, L3-4 y L4-5.

35 Durante la evaluación de la rigidez durante la flexión, la distancia entre cada uno de los respectivos procesos transversales adyacentes 26 de la columna vertebral, por lo tanto, el segmento de la columna vertebral que se extiende desde la vértebra lumbar L2 hasta la vértebra sacra S1, se midió con calibradores cuando el segmento de la columna vertebral se dispuso en un modo sin ninguna carga externa aplicada.

40 A partir de ese momento, la columna vertebral, por lo tanto, el segmento de la columna vertebral que se extiende desde la vértebra lumbar L2 hasta la vértebra sacra S1, se forzó manualmente a un modo de flexión lateral completa aplicando una fuerza externa a cada una de las dos porciones finales de la parte de la columna vertebral hasta alcanzar un límite crítico, es decir, hasta alcanzar el modo de flexión total. El movimiento de los procesos transversales sobre una fuerza aplicada se muestra esquemáticamente en la Fig. 4 mediante flechas con líneas discontinuas.

45 El límite crítico se definió como el punto justo antes del punto de ruptura del segmento de la columna vertebral. Por lo tanto, la fuerza externa se aplicó de tal manera que se obtuvo una flexión lateral máxima sin romper ninguna parte del segmento vertebral.

50 Se supuso que la fuerza era similar para el segmento de la columna vertebral en cada uno de los dos cerdos. En la posición de flexión lateral completa, la distancia entre los procesos transversales adyacentes para los discos L 2-3, L 3-4, L4-5 se midió con calibradores.

55 La distancia entre los procesos transversales adyacentes para un determinado disco en el modo sin carga externa se restaba de la distancia entre los mismos procesos transversales en el modo con una carga externa aplicada para

lograr el modo de flexión lateral completa, proporcionando de ese modo un valor de la distancia equilibrada obtenido por la flexión lateral completa. El valor equilibrado para el disco intervertebral inyectado refleja la rigidez a la flexión del disco intervertebral que se trata con una composición para su uso en el tratamiento del dolor relacionado con los discos intervertebrales en comparación con un disco intervertebral no inyectado.

La rigidez durante la flexión es una medida indirecta de la transformación del núcleo gelatinoso en tejido conectivo, ya que cuanto menor es el valor equilibrado, más rígido es el disco intervertebral. Cuanto más rígido sea el disco intervertebral, mayor será el contenido de tejido conectivo sólido y denso. Por lo tanto, la rigidez a la flexión indica si el núcleo gelatinoso ha sufrido una transformación en tejido conectivo, es decir, un envejecimiento acelerado, o no.

Las mediciones muestran que los discos inyectados (L 3-4) tenían un valor equilibrado mucho menor que los discos adyacentes no inyectados (L 2-3; L 4-5), lo que indica una mayor rigidez a la flexión del disco inyectado. Por lo tanto, se había producido una transformación acelerada del núcleo gelatinoso en tejido conectivo dentro del espacio del disco del disco inyectado en comparación con el interior del espacio del disco de los discos no inyectados (véase la Tabla 4).

Tabla 4. Diferencia de la distancia entre el proceso transversal antes y después de la flexión lateral completa (mm ± DT).

Disco intervertebral	Distancia (mm)
L 2-3	3,1 ± 1,1
L 3-4	0,3 ± 0,6
L 4-5	2,7 ± 0,9

3b - Dimensión del espacio del disco antes y después de la administración de la composición, respectivamente

Los discos intervertebrales (L2-3, L3-4, L4-5) se seccionaron y la longitud del espacio del disco (dirección anteroposterior) y el ancho (dirección bilateral) del espacio del disco se midieron con calibradores.

En las Figs. 5 y 6, un disco intervertebral se muestra esquemáticamente en sección transversal. El disco intervertebral comprende el anillo fibroso 10 y un espacio del disco definido por el anillo fibroso y que comprende el núcleo gelatinoso 11.

En la Fig. 5, una flecha muestra esquemáticamente cómo se mide la longitud antero-posterior del espacio del disco del disco intervertebral. En la Fig. 6, una flecha muestra esquemáticamente cómo se mide el ancho bilateral del espacio del disco del disco intervertebral.

Como se observa en las mediciones, la longitud antero-posterior promedio del espacio del disco fue significativamente menor en los discos inyectados (L 3-4) que en los discos adyacentes no inyectados (L2-3, L4-5) (véase la Tabla 5)

Tabla 5. Longitud media antero-posterior del espacio del disco (mm ± DT).

Disco intervertebral	Distancia (mm)
L 2-3	22,0 ± 1,0
L 3-4	13,5 ± 1,3
L 4-5	21,3 ± 2,2

Como se puede observar a partir de las mediciones, el ancho medio bilateral del espacio del disco era significativamente menor en los discos inyectados (L 3-4) que en los discos no inyectados adyacentes (L2-3, L4-5) (véase la Tabla 6).

Tabla 6. Ancho medio bilateral del espacio del disco (mm ± DT).

Disco intervertebral	Distancia (mm)
L 2-3	8,4 ± 0,7
L 3-4	4,0 ± 1,4
L 4-5	8,6 ± 2,3

La Fig. 7 muestra los discos intervertebrales L2-3, L3-4 y L4-5, respectivamente, de uno de los cerdos en los experimentos mencionados anteriormente. El ancho y la profundidad del espacio del disco se indican mediante

líneas rectas en negrita que corresponden a las figuras esquemáticas de la Fig. 5-6.

5 En la Fig. 7, se muestra además cómo el espacio del disco del disco inyectado L3-4 tenía un área transversal mucho más pequeña que los discos no inyectados L2-3 y L4-5, respectivamente. Por lo tanto, se puede verificar a simple vista que había tejido conectivo recién formado en el formador del espacio del disco que comprende el núcleo gelatinoso en los discos intervertebrales inyectados.

Conclusión de los experimentos

10 Es evidente que el espacio del disco en los dos discos no inyectados (L2-3) y (L4-5) es mucho más profundo y ancho que el disco (L3-4) que se había administrado con la composición que comprende ácido láctico. Parece que el antiguo espacio del disco se ha intercambiado con tejido conectivo recién formado (enfaticado por la decoloración, líneas adicionales en una disposición en forma de arco, en la Figura 7), de modo que el fibroso anular (formado por un anillo de tejido conectivo que comprende principalmente colágeno) se ha gastado a expensas del núcleo gelatinoso que ha disminuido de tamaño.

15 Por lo tanto, se logra una rigidez durante la flexión de los discos intervertebrales inyectados, y la rigidez puede suprimir el dolor experimentado por un paciente que tiene dolor relacionado con los discos intervertebrales. Una ventaja de esta forma de tratamiento del dolor relacionado con los discos intervertebrales, es que el tratamiento es menos invasivo que los métodos de tratamiento actuales, en comparación con el método de tratamiento actual de la artrodesis.

20 En los ejemplos que se han descrito anteriormente, el disco intervertebral estaba dispuesto en la columna lumbar. Sin embargo, se espera observar un proceso similar en un disco intervertebral dispuesto en la columna cervical o en la columna coxígea.

25 Para observar los efectos del ácido láctico a nivel celular, se llevaron a cabo estudios en fibroblastos, comúnmente presentes en el tejido conectivo como el anillo fibroso y las células del núcleo gelatinoso, comúnmente presentes en el núcleo gelatinoso, respectivamente. Como medida de cómo las células se transformaron en respuesta al tratamiento del ácido láctico, se estudió la producción de colágeno en las células.

Estudio de la producción de colágeno en fibroblastos tras el tratamiento con ácido láctico

35 Cultivo de fibroblastos dérmicos humanos adultos (HDFa)

Los fibroblastos dérmicos humanos aislados de piel adulta, los denominados HDFa, (Life Technologies Frederick, EE. UU.) se cultivaron y estudiaron. Las células maduras del disco intervertebral humano se han descrito como fibrocíticas (o similares a fibroblastos) en el anillo fibroso externo. Los fibroblastos son el tipo de célula más común que se encuentra en el tejido conectivo. Los fibroblastos pueden secretar naturalmente proteínas de colágeno que se utilizan para mantener un marco estructural para muchos tejidos y también desempeñan un papel importante en la curación de heridas.

40 En primer lugar, los fibroblastos criopreservados se descongelaron en un baño de agua a 37 °C. Los fibroblastos descongelados se dispersaron a continuación usando una pipeta de 1 mililitro para mover la suspensión de fibroblastos descongelados hacia arriba y hacia abajo en el vial. Los fibroblastos dispersos se diluyeron a continuación en solución de azul de tripano (Cat. N.º 15250-061, Lote N.º 1311086, Gibco Life Technologies), y la concentración de fibroblastos viables se determinó con un hemocitómetro.

45 Los fibroblastos dispersos se diluyeron de nuevo, esta vez en medio suplementado 106 a una concentración de 2,5 x 10⁴ fibroblastos viables por mililitro. A continuación se añadieron 5 ml de suspensión de fibroblastos a un matraz de cultivo de células T25 que tiene un volumen de 25 cm³ para conseguir una densidad inicial de 5,0 x 10³ fibroblastos viables por mililitro en el matraz T25 por dilución adicional con Medio 106 suplementado.

50 El Medio 106 suplementado consistió en Medio 106 (Cat. N.º M-106-500, Life Technologies, Paisley, Gran Bretaña) suplementado con Suplemento de bajo crecimiento sérico, LSGS, (Life Technologies, Paisley, Gran Bretaña) a una concentración de fetal suero bovino de un 2 % en volumen.

55 El matraz T25 que comprende los fibroblastos preparados se hizo girar para distribuir los fibroblastos en el medio. El cultivo celular se incubó a partir de ese momento en una incubadora de cultivo celular humidificada a 37 °C, con CO₂ al 5 %/aire al 95 % durante 72 horas.

60 En la confluencia, los fibroblastos se diluyeron en los medios suplementados para evitar alteraciones en el fenotipo celular.

65 Preparación de ácido láctico

El ácido láctico (Fluka 69775, Sigma-Aldrich, Estocolmo, Suecia) se pesó en un tubo estéril de 10 ml o un tubo de 50 ml. Se añadió agua Milli-Q ($> 18,2 \Omega$) para preparar una solución de reserva de ácido láctico. La solución de reserva se mezcló y almacenó antes de preparar soluciones finales de ácido láctico con concentraciones variables. El periodo de almacenamiento fue inferior a 1 hora a temperatura ambiente, o, como alternativa, inferior a 24 horas a una temperatura de 4 °C.

Efecto del ácido láctico en la producción de colágeno en fibroblastos dérmicos humanos adultos (HDFa)

Los fibroblastos cultivados como se ha descrito anteriormente se separaron del matraz de cultivo celular y se colocaron en placas de 6 pocillos a una densidad inicial de $6,0 \times 10^4$ células viables por pocillo. Los fibroblastos se cultivaron en medio 106 suplementado. Los fibroblastos en algunos de los pocillos también se trataron con ácido láctico (Fluka 69775, Sigma-Aldrich, Estocolmo, Suecia) en varias concentraciones: 0, 0,5, 2, 5, 10, 20 y 50 mg/ml, respectivamente. Los fibroblastos se incubaron en una incubadora de cultivo celular humidificada a 37 °C, con CO₂ al 5 %/aire al 95 % durante 48 horas.

Para estudiar el efecto del ácido láctico en la producción de colágeno en los fibroblastos, se aplicó un método espectrofotométrico llamado Ensayo de colágeno soluble (QuickZyme Biosciences, Leiden, Países Bajos) basado en la unión del colorante Rojo Sirius al colágeno. El estudio se realizó dos veces.

Los medios celulares se recogieron de cada pocillo y se pipetearon 140 µl en una placa de 96 pocillos. Se tomaron muestras por duplicado. Las muestras medianas se mezclaron completamente con 60 µl de solución de colorante Rojo Sirius pipeteando hacia arriba y hacia abajo al menos cinco veces. La placa de 96 pocillos se centrifugó a 3000 x g durante 1 hora. Todos estos pasos se realizaron a una temperatura inferior a 25 °C, por ejemplo, la centrifugación se realizó a 25 °C.

La muestra centrifugada se lavó y se retiró el sobrenadante. El sedimento celular se resuspendió en 150 µl de solución de detección mezclándolo completamente pipeteando hacia arriba y hacia abajo al menos diez veces. A continuación, se transfirieron 100 µl de cada muestra a una nueva placa de 96 pocillos y el contenido de colágeno se midió por vía espectrofotométrica a una densidad óptica de 540 nm.

A partir de los dos estudios realizados cada uno por duplicado, se demostró claramente que la adición de ácido láctico a los fibroblastos aumenta la producción promedio de colágeno en los fibroblastos, como se indica en la Tabla 7 y en la Figura 8. La producción promedio se midió después de 2 días de tratamiento con ácido láctico.

En la Figura 8, los resultados del primer conjunto del estudio se presentan por diamantes, mientras que los resultados del segundo conjunto del estudio se presentan por cuadrados. Se ha incluido una línea de tendencia promedio móvil de dos períodos para mostrar esquemáticamente la tendencia en la producción de colágeno para cada conjunto. La línea de tendencia para el primer conjunto se presenta mediante una línea punteada, y la línea de tendencia para el segundo conjunto se presenta mediante una línea discontinua, respectivamente. El eje x muestra la concentración del ácido láctico agregado a los pocillos que comprenden fibroblastos, y el eje y muestra la cantidad promedio de colágeno producido en estos pocillos tras la medición después de dos días desde la adición del ácido láctico en los pocillos.

Más en particular, el aumento en la producción de colágeno fue significativo cuando se añadió ácido láctico a una concentración de al menos 2 mg/ml, como al menos 5 mg/ml, en el pocillo. Además, se demostró que la producción de colágeno aumentó al aumentar la concentración de ácido láctico hasta al menos 20 mg/ml o al menos 50 mg/ml como también se indica en la Figura 8.

Tabla 7. Efecto en la producción de colágeno en fibroblastos de ácido láctico.

Concentración de ácido láctico [mg/ml]	1 ^{er} conjunto de estudio: cantidad media de colágeno producido por pocillo [µg]	Desviación estándar en el 1 ^{er} conjunto de estudio	2 ^o conjunto de estudio: cantidad media de colágeno producido por pocillo [µg]	Desviación estándar en el 2 ^o conjunto de estudio
0	0,033	0,1	0,0711	0,111
0,5	10,8	12	0,0995	0,0435
2	9,57	4	8,94	5,72
5	21,2	0,8	12,0	0,281
10	16,7	1	18,8	4,46
20	19,3	1,5	25,5	2,15
50	20,6	1	28,2	0,24

Como la producción media de colágeno se correlaciona con el número de células capaces de producir colágeno, la ligera diferencia en la producción promedio de colágeno entre el primer conjunto y el segundo conjunto del estudio se puede deber a una variación natural en el número de células en los pocillos estudiados.

5 Estudio de la producción de colágeno en células del núcleo gelatinoso tras el tratamiento con ácido láctico

Cultivo de células del núcleo gelatinoso humano

10 Las células del núcleo pulposo (NP) aisladas de seres humanos (4800, ScienCell, EE. UU.) se cultivaron y estudiaron. Las células NP son células de disco intervertebral en el núcleo gelatinoso.

15 En primer lugar, las células NP criopreservadas se descongelaron en un baño de agua a 37 °C. Las células NP descongeladas se suspendieron a condensación en medio de células de núcleo pulposo suplementado, y a condensación se sembraron en un matraz de cultivo de células T75 que tenía un volumen de 75 cm³ y se recubrieron por dentro con poli-L-lisina (0413, ScienCell, EE. UU.). La densidad de siembra inicial fue de 5,0 x 10³ células NP viables por mililitro.

20 El Medio celular del núcleo pulposo suplementado consistió en medio celular del núcleo pulposo (4801, Scien-Cell, EE. UU.) suplementado con un 2 % en volumen de suero fetal bovino (0010, ScienCell, EE. UU.), 1X del suplemento de crecimiento celular del núcleo pulposo (4852, ScienCell, EE. UU.) y 1X de solución de penicilina/estreptomicina (0503, ScienCell, EE. UU.).

25 El matraz T75 que comprende las células NP preparadas se agitó para distribuir las células NP en el medio. El cultivo celular se incubó posteriormente en una incubadora de cultivo celular humidificada a 37 °C, con CO₂ al 5 %/aire al 95 % durante la noche.

En la confluencia, los fibroblastos se diluyeron en los medios suplementados para evitar alteraciones en el fenotipo celular, la proliferación celular y/o la diferenciación celular.

30 Preparación de ácido láctico

35 El ácido láctico (PURAC PF 90, lote N.º 1406001940, Corbion Purac, Países Bajos) se pesó en un tubo estéril de 10 ml o 50 ml. Se añadió agua Milli-Q (> 18,2 Ω) para preparar una solución de reserva de ácido láctico. La solución de reserva se mezcló y almacenó antes de preparar soluciones finales de ácido láctico con concentraciones variables. El periodo de almacenamiento fue inferior a 1 hora a temperatura ambiente, o, como alternativa, inferior a 24 horas a una temperatura de 4 °C.

Efecto del ácido láctico en la producción de colágeno en células del núcleo gelatinoso humanas

40 Las células NP cultivadas como se al escrito anteriormente se separaron del matraz de cultivo celular y se colocaron en placas de 6 pocillos a una densidad inicial de 4,5 x 10⁴ células viables por pocillo. Las células NP se cultivaron en medio de células de núcleo pulposo suplementado. Las células NP en algunos de los pocillos también se trataron con ácido láctico (PURAC PF 90, lote N.º 1406001940, Corbion Purac, Países Bajos) en varias concentraciones: 0, 0,5, 5, 10, 20 y 50 µg/ml, respectivamente. Las células NP se incubaron en una incubadora de cultivo celular humidificada a 37 °C, con CO₂ al 5 %/aire al 95 % durante 48 horas.

50 Para estudiar el efecto del ácido láctico sobre la producción de colágeno en las células NP, se aplicó un método espectrofotométrico llamado Ensayo de colágeno soluble (QuickZyme Biosciences, Leiden, Países Bajos) basado en la unión del colorante Rojo Sirius al colágeno.

55 Los medios celulares se recogieron de cada pocillo y se pipetearon 140 µl en una placa de 96 pocillos. Se tomaron muestras por triplicado. Las muestras medianas se mezclaron completamente con 60 µl de solución de colorante Rojo Sirius pipeteando hacia arriba y hacia abajo al menos cinco veces. La placa de 96 pocillos se centrifugó a 1500 x g durante 2 horas. Todas estas etapas se llevaron a cabo a una temperatura inferior a 25 ° C, por ejemplo, la centrifugación se realizó a 4 °C.

60 La muestra centrifugada se lavó y se retiró el sobrenadante. El sedimento celular se resuspendió en 150 µl de solución de detección mezclándolo completamente pipeteando hacia arriba y hacia abajo al menos diez veces. A continuación, se transfirieron 100 µl de cada muestra a una nueva placa de 96 pocillos y el contenido de colágeno se midió por vía espectrofotométrica a una densidad óptica de 540 nm.

Para adaptarse al aparato de medición, las células se diluyeron en solución tampón de fosfato (PBS) en una proporción de 1:1.

65 A partir del estudio llevado a cabo por triplicado, se demostró claramente que la adición de ácido láctico a las células NP aumenta la producción promedio de colágeno en las células NP, como se indica en la Tabla 8 y en la Figura 9.

La producción media se midió después de 2 días de tratamiento con ácido láctico.

5 En la Figura 9, los resultados del estudio son presentan por diamantes. Se ha incluido una línea de tendencia promedio móvil de dos periodos para mostrar esquemáticamente la tendencia en la producción de colágeno. El eje x muestra la concentración del ácido láctico agregado a los pocillos que comprenden células NP, y el eje y muestra la cantidad promedio de colágeno producido en estos pocillos tras la medición después de dos días desde la adición del ácido láctico a los pocillos.

10 Más en particular, el aumento en la producción de colágeno fue significativo cuando se añadió ácido láctico a una concentración de al menos 5 mg/ml en el pocillo. Además, se demostró que la producción de colágeno aumentó al aumentar la concentración de ácido láctico hasta aproximadamente 10-20 mg/ml, en la que se alcanzó una meseta como también se indica en la Figura 9. La disminución en la producción de colágeno a 50 mg/ml se interpreta de modo tal que un tratamiento con ácido láctico en una concentración tan elevada puede tener efectos citotóxicos que causan la muerte celular.

15

Tabla 8. Efecto en la producción de colágeno en células NP de ácido láctico.

Concentración de ácido láctico [mg/ml]	Cantidad media de colágeno producido por pocillo [μ g]	Desviación estándar
0	2,33	0,267
0,5	3,58	1,48
5	16,4	0,339
10	25,3	1,11
20	27,2	0,513
50	25,2	2,82

Conclusión

20 Los inventores creen que el uso de acuerdo con las realizaciones de la presente invención tratará el dolor relacionado con los discos intervertebrales también en seres humanos.

25 La transformación esperada en tejido conectivo del disco intervertebral sometido a inyección de una sustancia, como un ácido láctico, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, puede observarse *in vivo*. Por lo general, el procedimiento se llevará a cabo bajo anestesia o sedación ligera, y mediante el uso de orientación radiológica. Por lo tanto, el procedimiento de tratamiento será similar a una evaluación radiológica del disco intervertebral, una llamada discografía, cuando se inyecta un medio de contraste en el disco intervertebral bajo guía radiológica.

30 Otras sustancias capaces de inducir la degeneración acelerada de un disco intervertebral también se pueden considerar sustitutos y/o alternativas al ácido láctico o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.

REIVINDICACIONES

- 5 1. Una composición para su uso en el tratamiento del dolor relacionado con los discos intervertebrales, en el que dicha composición comprende ácido láctico, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, en el que dicha composición se administra a un espacio del disco que comprende el núcleo gelatinoso de un disco intervertebral.
- 10 2. La composición para su uso de acuerdo con la reivindicación 1, en el que la composición se administra en una cantidad eficaz para aumentar la concentración de ácido láctico, o la concentración de iones lactato de la sal farmacéuticamente aceptable, en dicho espacio del disco a más de 12 mmol/l.
- 15 3. La composición para su uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 2, en el que la concentración de ácido láctico, o la concentración de iones lactato de la sal farmacéuticamente aceptable, en la composición es al menos 12 mmol/l, por ejemplo dentro del intervalo de 12 a 12000 mmol/l, tal como de 100 a 10000 mmol/l, tal como de 500 a 5000 mmol/l, tal como de 800 a 2000 mmol/l.
- 20 4. La composición para su uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en el que la sal farmacéuticamente aceptable es un lactato de cualquiera de los elementos seleccionados entre el grupo que consiste en: los metales alcalinos y los metales alcalinotérreos.
- 25 5. La composición para su uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en el que la sal farmacéuticamente aceptable se selecciona entre el grupo que consiste en: lactato de amonio, lactato de colina, lactato de litio, lactato de sodio, lactato de potasio, lactato de berilio, lactato de magnesio y lactato de calcio.
- 30 6. La composición para su uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en el que dicha composición se administra al espacio del disco de un disco intervertebral que contribuye al dolor relacionado con los discos intervertebrales.
- 35 7. La composición para su uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en el que dicho ácido láctico o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, se administra mediante inyección local en el espacio del disco que comprende el núcleo gelatinoso.
- 40 8. La composición para su uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, en el que el ácido láctico se administra en una dosificación única dentro del intervalo de 2 mg a 200 mg.
- 45 9. La composición para su uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, en el que el ácido láctico se administra en una dosificación única dentro del intervalo de 5 mg a 200 mg, tal como de 10 a 100 mg, tal como de 10 a 50 mg, tal como de 15 a 30 mg.
- 50 10. La composición para su uso de acuerdo con la reivindicación 8 o 9, en el que dicho ácido láctico o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, se administra en una sola ocasión en dicha dosificación única.
11. La composición para su uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10, en el que dicha composición está en forma de una solución acuosa que comprende dicho ácido láctico o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.
12. La composición para su uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 11, en el que dicho dolor relacionado con los discos intervertebrales se selecciona entre dolor de cuello, dolor de cuello crónico, dolor lumbar, y dolor lumbar crónico.
13. La composición para su uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 11, en el que dicho dolor relacionado con los discos intervertebrales es coxigodinia.

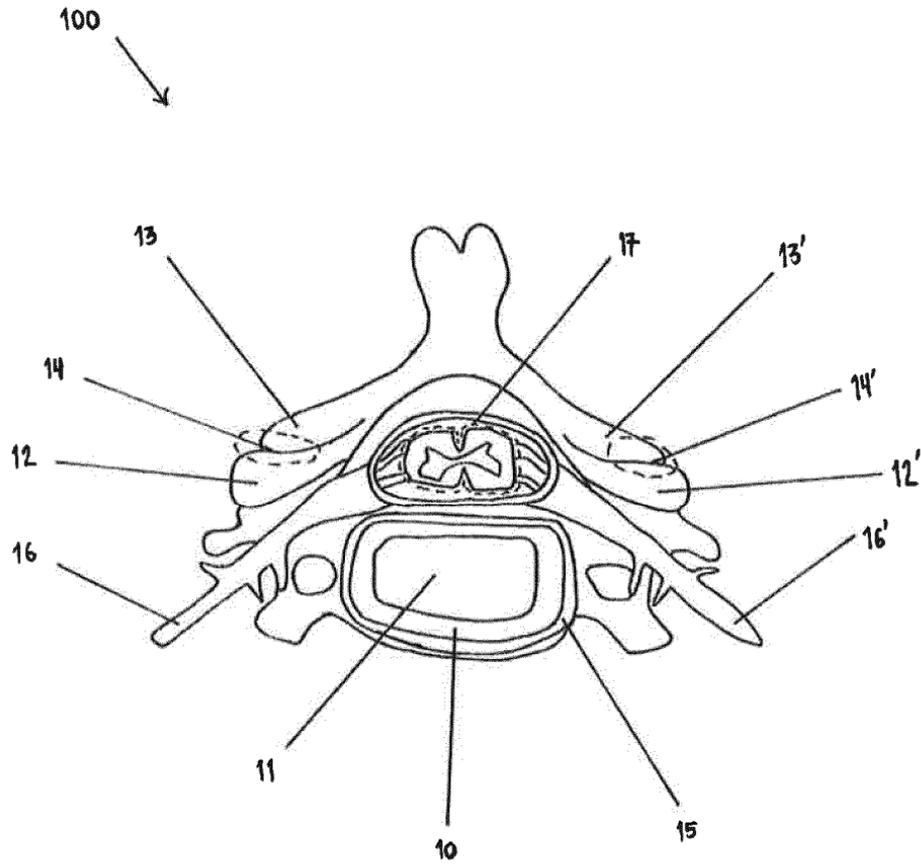


Figura 1

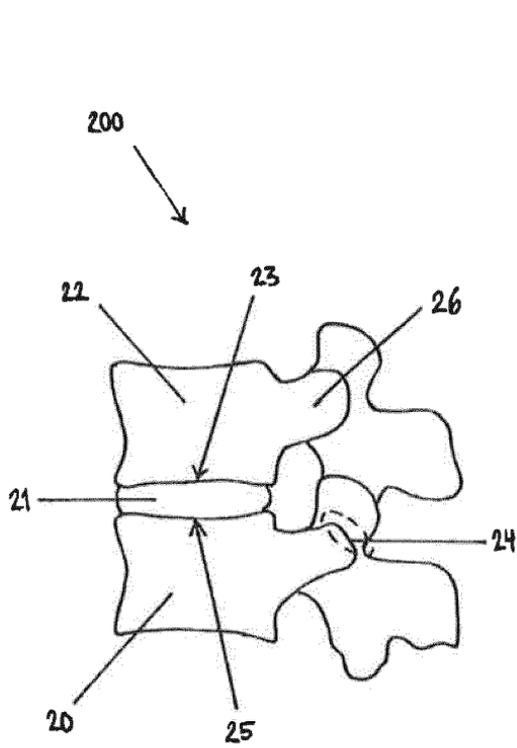


Figura 2

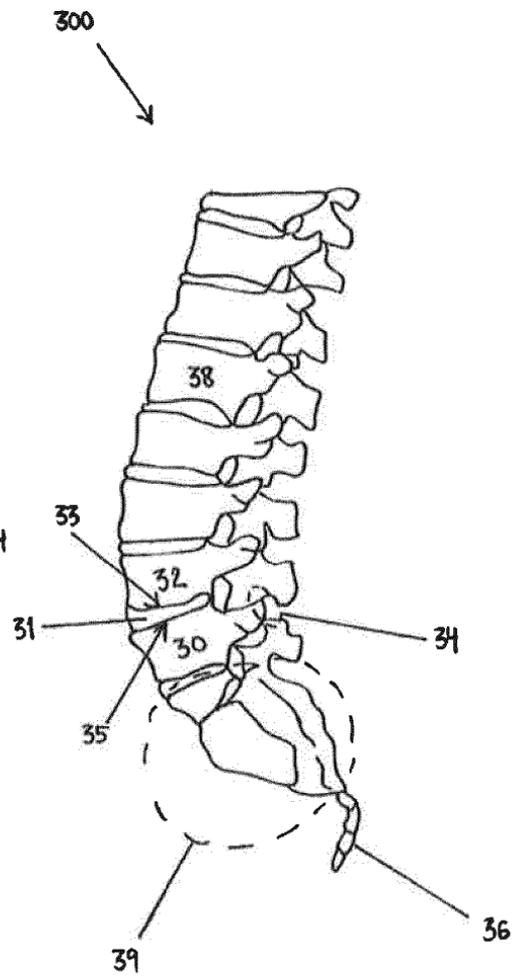


Figura 3

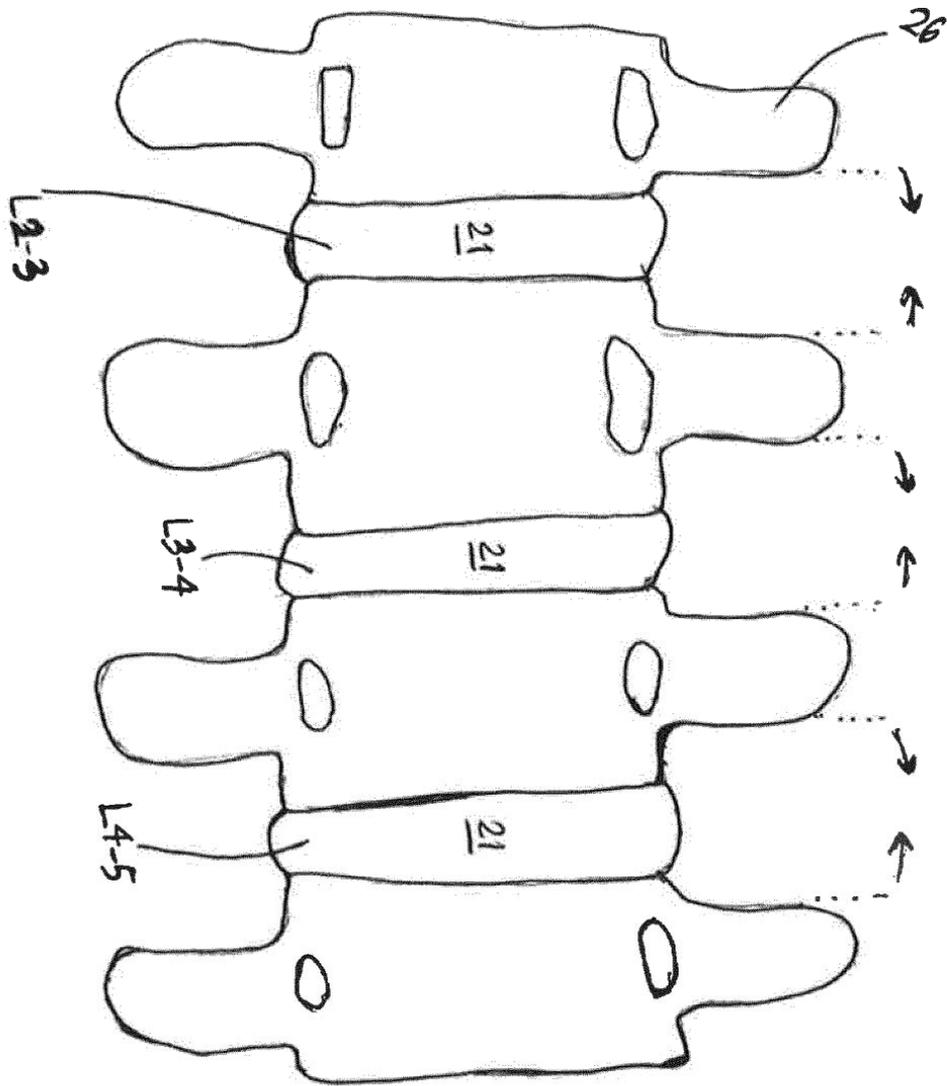


Figura 4

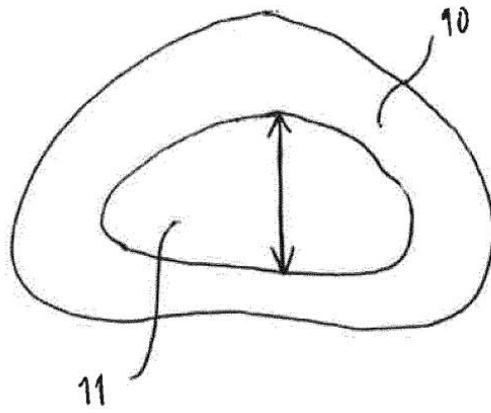


Figura 5

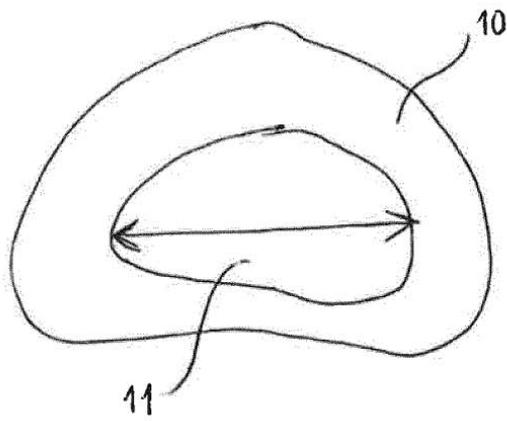


Figura 6

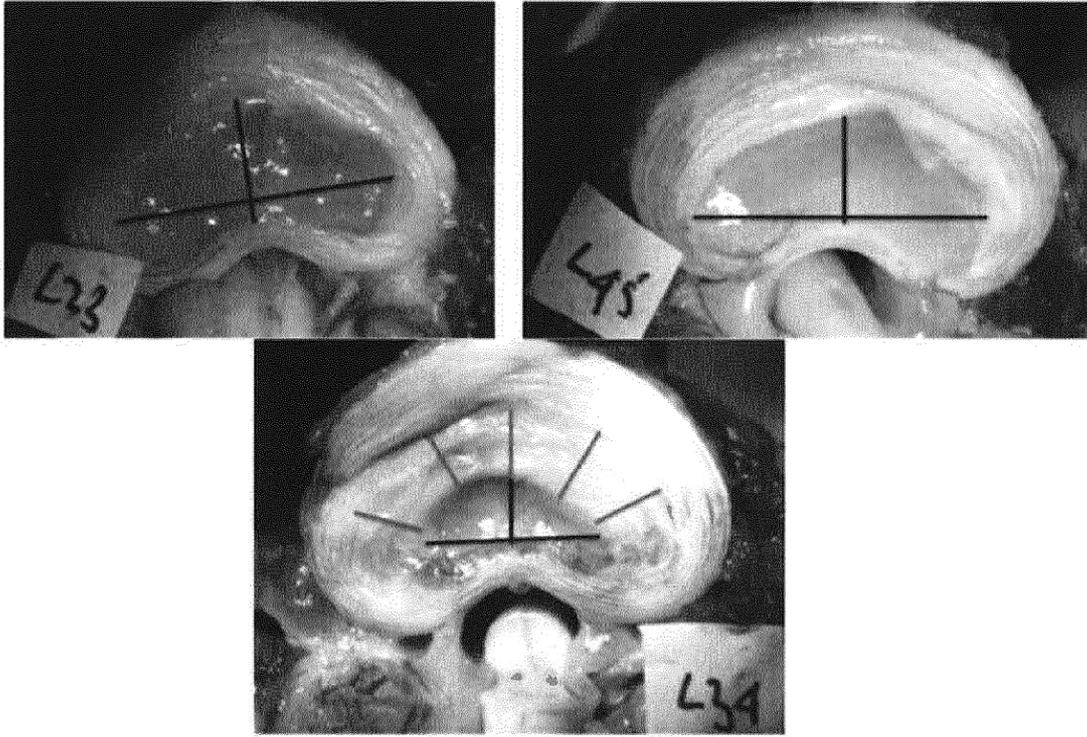


Figura 7

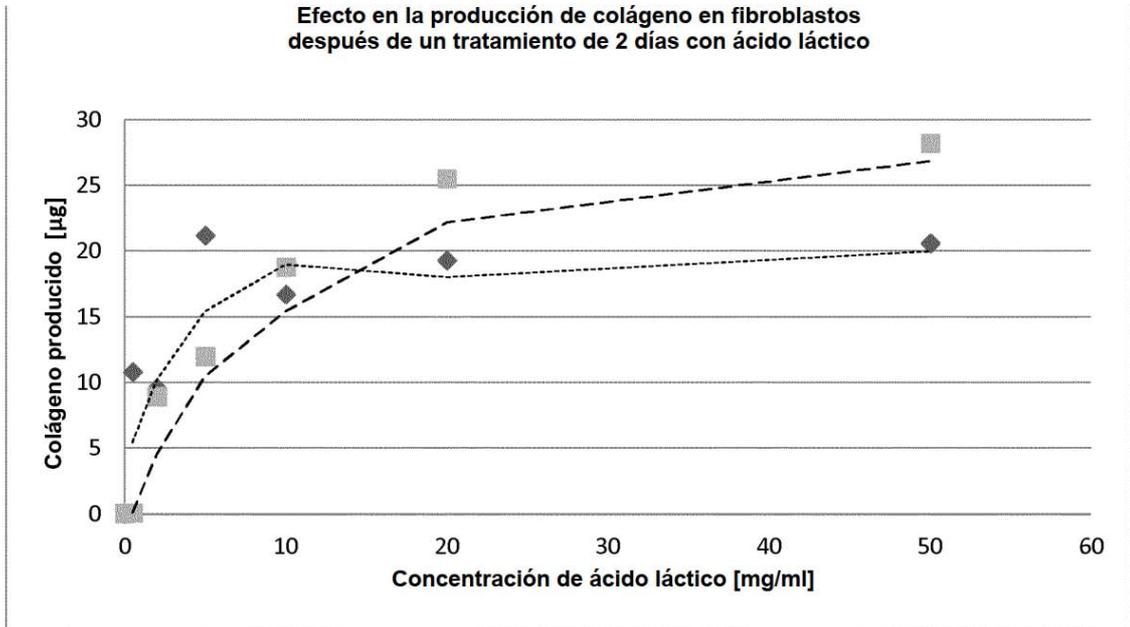


Figura 8

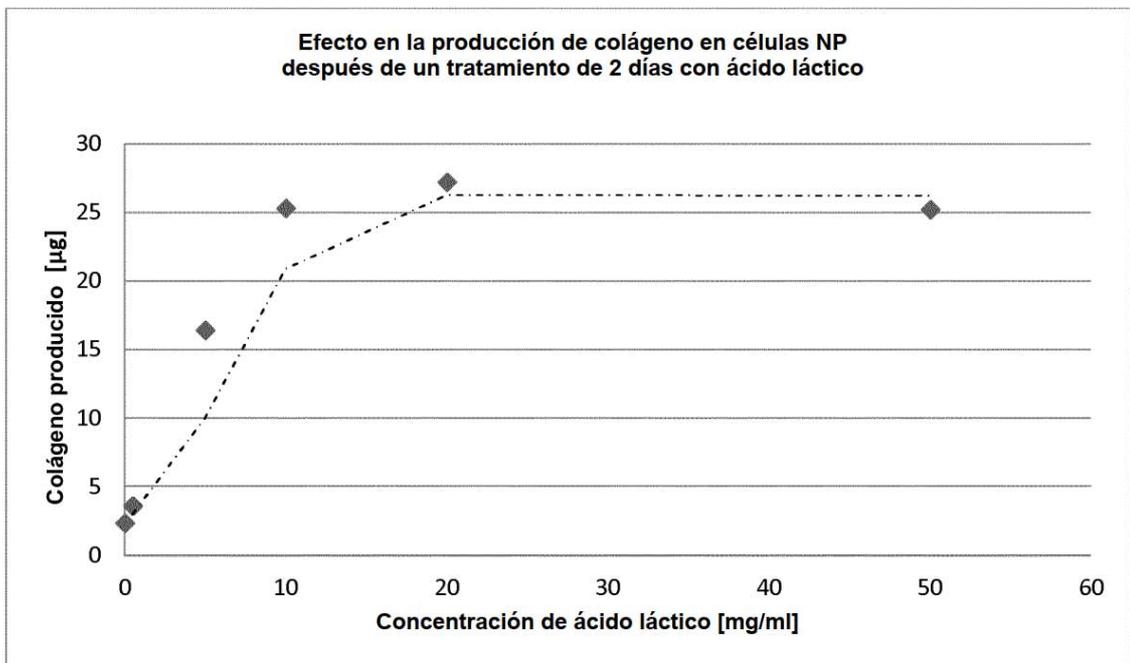


Figura 9