

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 800 524**

51 Int. Cl.:

A61K 49/00

(2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **08.12.2014** **PCT/JP2014/082441**

87 Fecha y número de publicación internacional: **18.06.2015** **WO15087839**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **08.12.2014** **E 14870461 (2)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **08.04.2020** **EP 3081234**

54 Título: **Composición de imagen de cartílago articular**

30 Prioridad:

13.12.2013 JP 2013257892

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

30.12.2020

73 Titular/es:

MERCURY ASSET MANAGEMENT CO., LTD.
(50.0%)

**11F Aqua Dojima NBF Tower 4-16, Dojimahama 1-
chome Kita-ku Osaka-shi**
Osaka 530-0004, JP y
FUJIWARA, YASUNORI (50.0%)

72 Inventor/es:

MIZUNO, SHUICHI;
KAWAGUCHI, NOBUAKI;
TSUCHIYA, AKIHIRO y
MANOME, YOSHINOBU

74 Agente/Representante:

ELZABURU, S.L.P

Observaciones:

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

ES 2 800 524 T3

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

DESCRIPCIÓN

Composición de imagen de cartílago articular

Campo de la invención

La presente invención se refiere a una composición de imagen de cartílago articular que se absorbe específicamente en una zona dañada de cartílago articular, visualizando de este modo la zona dañada de cartílago articular.

Antecedentes de la técnica

La osteoartritis (OA) es un trastorno articular, que presumiblemente está inducido por la degeneración del cartílago articular como causa principal, y que se observa frecuentemente, p.ej., en las articulaciones de la rodilla, la cadera y el fémur. La OA está causada no solo por la edad y la sobrecarga sino también por lesiones deportivas y la obesidad. En concreto, se estima que el número de pacientes con osteoartritis de rodilla es de 25 300 000 en Japón (proyecto ROAD, el "Centro Médico y de Investigación del siglo XXII", Hospital de la Universidad de Tokio, 2009) y es del doble o más en los Estados Unidos que en Japón. Asimismo, en áreas densamente pobladas como China, India y los países africanos en los que se considera que, p.ej., las condiciones de trabajo y las condiciones ambientales son más severas que en Japón, el número de pacientes de OA aumentará a partir de ahora. En la actualidad, en Japón, se reporta que 75 000 pacientes son sometidos a cirugía de sustitución con articulación de rodilla artificial como terapia final (Yano Research Institute Ltd., 2011). La sustitución con articulación artificial *per se* es una terapia altamente invasiva. Adicionalmente, la vida mecánica de la articulación artificial es limitada y dependiendo de las circunstancias la articulación artificial debe ser reemplazada repetidamente.

Para prevenir una exacerbación de la osteoartritis de rodilla y evitar la consiguiente cirugía de sustitución con articulación artificial, es importante recibir un tratamiento apropiado de forma temprana. Para el tratamiento temprano, se requiere una detección temprana de la degeneración del cartílago; sin embargo, es difícil detectar la degeneración de cartílago en las etapas tempranas mediante un sistema convencional de imágenes de rayos X (fotografía roentgen) y un escáner convencional de IRM (Imagen por Resonancia Magnética). La presencia o la ausencia de degeneración de cartílago también se puede comprobar observando el cartílago mediante el uso de un artroscopio (una especie de endoscopio); sin embargo, en este método, el médico responsable toca la zona de la capa superficial del cartílago mediante el uso de una herramienta tal como un fórceps en un artroscopio y determina la presencia o la ausencia de degeneración de cartílago en base al sentido del tacto. Por ello, la detección temprana queda básicamente en manos de la experiencia y la habilidad del doctor. Adicionalmente, existe el problema de que no se puede identificar claramente la línea de frontera entre el cartílago normal y el cartílago degenerativo.

Si existe un método de examen no invasivo o menos invasivo que permita la detección temprana de la degeneración de cartílago sin depender solo de la experiencia o la habilidad de un médico, se puede determinar la presencia o la ausencia de progreso de la degeneración de cartílago y se puede crear fácilmente una estrategia terapéutica. Como método de examen no invasivo o menos invasivo, se conoce un método que emplea una técnica de imagen *in vivo* para visualizar un tejido vivo. Como técnica de imagen *in vivo*, se conocen varias técnicas, que incluyen la tomografía de emisión de positrones (TEP), la imagen por resonancia magnética nuclear (IRM), la ultrasonografía (US) y la imagen fotoacústica (PAI, del inglés "photoacoustic imaging"). Además de éstas, también se conoce una técnica de imagen por fluorescencia tal como la tomografía de molécula fluorescente (FMT), en la que una sustancia fluorescente es enfocada sobre una zona de interés de un cuerpo vivo y la zona es capturada con una alta sensibilidad. La técnica de imagen por fluorescencia ha atraído la atención debido a que puede visualizar de forma no invasiva la zona de interés de un modo específico.

Para aplicar la técnica mencionada anteriormente de imagen por fluorescencia *in vivo* a cartílago articular, se han propuesto varias técnicas relacionadas con una sonda de imagen que se une específicamente a un tejido de cartílago articular y que se acumula sobre él. En Bibliografía de Patente 1, se describe un marcador de cartílago que se une específicamente a una matriz de cartílago, que se obtiene permitiendo que un medio de generación de señal, tal como una sustancia fluorescente, se una a un péptido de poliarginina que tiene de 6 a 20 residuos de arginina o a un péptido de polilisina que tiene de 6 a 20 residuos de lisina. Adicionalmente, en la Bibliografía de Patente 2, se describe un marcador de tejido de cartílago, que consiste en un derivado de oligómero de lisina obtenido permitiendo que un grupo capaz de generar o absorber una onda electromagnética se una a un oligómero de lisina en el que el grupo ϵ -amino de la lisina y un grupo carboxilo están conectados a través de un enlace peptídico.

Lista de referencias

Bibliografía de Patentes

Bibliografía de Patente 1: Patente abierta japonesa N° 2009-023993

Bibliografía de Patente 2: Publicación internacional n° WO 2013/137302

Sumario de la invención

Problema técnico

La Bibliografía de Patente 1 y la Bibliografía de Patente 2 establecen que dichos marcadores de cartílago se unen específicamente a cartílago articular normal; sin embargo, no aportan información sobre cómo actúan con cartílagos anormales, es decir, cartílago degenerativo, tal como osteoartritis. Para describir más específicamente, actualmente

existe el problema de que no hay ninguna composición de imagen diagnóstica de cartílago articular que puede visualizar de forma claramente distinguible una zona normal y una zona anormal en un cartílago articular.

Adicionalmente, como se ha descrito anteriormente, se ha deseado desarrollar un método de examen que permita la detección temprana de la degeneración de cartílago sin requerir mucha experiencia y habilidad por parte de un médico.

La presente invención se ha concebido en consideración a las circunstancias mencionadas anteriormente. La presente invención se refiere a una composición adecuada para su uso en la visualización de una zona degenerativa en cartílago articular, que se caracteriza por contener una albúmina cargada positivamente con verde de indocianina.

En otro aspecto, la invención proporciona una composición para visualizar una zona degenerativa en un cartílago articular, donde la zona degenerativa del cartílago articular presenta una capa dañada de un tejido de cartílago, o presenta una porción defectuosa desde la capa superficial hacia la porción profunda de un tejido de cartílago.

Solución al problema

Para alcanzar los objetivos mencionados anteriormente, la composición de imagen de cartílago articular de la presente invención contiene una molécula cargada positivamente, que está marcada con una molécula marcadora. El cartílago normal presenta una capa superficial formada por una pluralidad de capas que consisten en células planas. Por otro lado, el cartílago degenerativo presenta un estado en el que una capa de células es eliminada y la matriz de cartílago rica en fibra y que presenta una estructura de tejido irregular es expuesta o un estado en el que se forma un defecto desde la capa superficial hacia la zona profunda. La composición de imagen de cartílago articular de la presente invención contiene una molécula cargada positivamente con una molécula marcadora. La molécula cargada positivamente penetra de forma intensiva en la matriz de cartílago expuesta y se absorbe en la misma. Del mismo modo, puesto que la composición de imagen de cartílago articular de la presente invención se absorbe de forma intensiva en una zona degenerativa de cartílago, se pueden visualizar de forma distinguible las zonas normales de las zonas degenerativas del cartílago articular.

La molécula cargada positivamente de la composición de imagen de cartílago articular de la presente invención preferiblemente es una proteína o compuesto peptídico cargados positivamente. Como molécula cargada positivamente que actúa como constituyente de la composición de imagen de cartílago articular, se selecciona una sustancia que esté ubicuamente presente en el cuerpo vivo, que presente una elevada seguridad, y que sea fácil de manipular y que se pueda marcar de forma sencilla con una molécula marcadora.

La proteína o compuesto peptídico de la composición de imagen de cartílago articular de la presente invención preferiblemente es albúmina, un producto de descomposición de la albúmina o un compuesto de albúmina modificada. Por consiguiente, se selecciona una sustancia preferible como proteína o compuesto peptídico que constituye la molécula cargada positivamente.

La molécula cargada positivamente de la composición de imagen de cartílago articular de la presente invención preferiblemente es de forma adicional un compuesto cargado positivamente que presenta una cadena de sacárido. Como molécula cargada positivamente que actúa como constituyente de la composición de imagen de cartílago articular, se selecciona una sustancia que esté ubicuamente presente en un cuerpo vivo, que presente una elevada seguridad, y que sea fácil de manipular y que se pueda marcar de forma sencilla con una molécula marcadora.

El compuesto que presenta una cadena de sacárido de la composición de imagen de cartílago articular de la presente invención preferiblemente es dextrano, ciclodextrina o un derivado de los mismos. Por consiguiente, se selecciona una sustancia preferible como compuesto que presenta una cadena de sacárido que constituye la molécula cargada positivamente.

La molécula marcadora de la composición de imagen de cartílago articular de la presente invención preferiblemente es al menos una sustancia seleccionada del grupo que consiste en una sustancia fluorescente, un radioisótopo, una sustancia que absorbe rayos-X, una molécula de anticuerpo y una molécula que presenta un sitio de reconocimiento reconocido por un anticuerpo específico. Dado que las moléculas cargadas positivamente mencionadas están marcadas con una molécula marcadora, la posición de la molécula cargada positivamente adsorbida sobre una zona de cartílago degenerativo puede visualizarse a través de una sustancia fluorescente, un radioisótopo, una sustancia que absorbe rayos-X, una molécula de anticuerpo o una molécula que presenta un sitio de reconocimiento reconocido por un anticuerpo específico.

Entre las moléculas marcadoras mencionadas, la sustancia fluorescente preferiblemente es verde de indocianina. Por consiguiente, se puede seleccionar una molécula marcadora que presente una elevada seguridad, que visualice y detecte de forma efectiva una zona degenerativa.

La molécula marcadora de la composición de imagen de cartílago articular de la presente invención preferiblemente es al menos una sustancia seleccionada del grupo que consiste en una partícula magnética, una partícula metálica, una nanopartícula metálica y otra sustancia que contiene nano-materiales. Por consiguiente, la posición de la molécula cargada positivamente adsorbida sobre una zona de cartílago degenerativo puede detectarse, p.ej., mediante TC de rayos X, IRM, espectroscopía Raman o un método de resonancia de plasmón.

Efectos ventajosos de la invención

Según la presente invención, es posible proporcionar una composición de imagen de cartílago articular que presente los siguientes efectos excelentes.

(1) Se pueden visualizar de forma claramente distinguible una zona normal y una zona anormal (zona degenerativa) en cartílago articular.

(2) Se puede detectar de forma temprana la degeneración de cartílago, y se puede identificar de forma sencilla y precisa un grado de degeneración.

(3) Se puede realizar el diagnóstico o tratamiento visualizando una zona degenerativa en cartílago articular *in vivo* usando una composición de imagen de cartílago articular en diagnóstico o cirugía con artroscopio.

(4) Se puede diagnosticar un estado degenerativo de cartílago de forma no invasiva o de forma menos invasiva usando una técnica de imagen *in vivo*, p.ej., inyectando la composición de imagen de cartílago articular en un espacio de la articulación.

(5) La composición de imagen de cartílago articular es fácil de manipular, ya que está constituida por sustancias altamente seguras. Asimismo, los productos de descomposición de la misma también son altamente seguros.

(6) Una vez completado el examen y la cirugía, la composición de imagen de cartílago articular es eliminada fácilmente a través del metabolismo, de hidrólisis o de dilución con fluido del tejido.

Breve descripción de las figuras

Figura 1: es una fotografía que muestra los resultados de electroforesis de punto isoeléctrico de una albúmina de suero bovino cargada positivamente del Ejemplo 1.

Figura 2: es una fotografía que muestra la emisión fluorescente que se produce como resultado de la unión de una albúmina cargada positivamente o de una albúmina a verde de indocianina del Ejemplo 2.

Figura 3: es una fotografía que muestra los resultados de imagen de un modelo de daño de cartílago con la composición de imagen de cartílago articular de la presente invención del Ejemplo 3.

Figura 4: es una fotografía que muestra los resultados de imagen de un modelo de daño de cartílago y un modelo de cartílago intacto con la composición de imagen de cartílago articular de la presente invención del Ejemplo 4.

Figura 5: es una fotografía que muestra los resultados de imagen de un cartílago dañado de un humano con la composición de imagen de cartílago articular de la presente invención del Ejemplo 5.

Descripción de realizaciones

La composición de imagen de cartílago articular de la presente invención contiene una molécula marcada cargada positivamente. En la presente invención, la "molécula cargada positivamente" se refiere a una molécula que presenta una carga positiva (carga catiónica) y capaz de adsorberse selectivamente en cartílago degenerativo.

El cartílago se clasifica en el tejido conectivo y está constituido por matriz de cartílago como matriz extracelular, presente predominantemente y células de cartílago presentes como puntos. El cartílago que constituye una articulación se denomina cartílago hialino. Los principales componentes de la matriz de cartílago del cartílago hialino son colágeno y proteoglicano. El proteoglicano contiene una cadena lateral que presenta una carga negativa tal como sulfato de condroitina, sulfato de queratano y sulfato de heparano y cargado negativamente de forma global. El cartílago normal presenta una capa superficial formada por una pluralidad de capas que consisten en células planas. Por otro lado, el cartílago degenerativo presenta un estado en el que la capa celular es eliminada y la matriz de cartílago rica en fibra y que tiene una estructura de tejido irregular es expuesto o un estado en el que un defecto se forma desde la capa superficial hacia la zona profunda. La molécula cargada positivamente contenida en la composición de imagen de cartílago articular de la presente invención se asume que se adsorbe específicamente en el proteoglicano presente en la matriz de cartílago expuesta después de que se haya eliminado la capa superficial del tejido de cartílago.

La molécula cargada positivamente en la presente invención no está particularmente limitada, siempre que la molécula pueda adsorberse selectivamente en cartílago degenerado; sin embargo, con vistas a la seguridad y la facilidad de manipulación, es preferible una proteína cargada positivamente o compuesto peptídico o un compuesto cargado

positivamente que tenga una cadena de sacárido. Nótese que la “proteína” en la presente memoria incluye una amplia variedad de proteínas tales como una glicoproteína, una lipoproteína y una proteína de unión a nucleótido.

Como proteína o compuestos peptídicos cargados positivamente para su uso como molécula cargada positivamente en la presente invención, son preferibles las proteínas de plasma y diversos tipos de albúminas, y particularmente es preferible una albúmina de suero. Las proteínas de plasma y los diversos tipos de albúminas incluyen productos de descomposición y compuestos modificados de albúminas. La albúmina cargada positivamente (albúmina cationizada) se adsorbe específicamente a la matriz de cartílago; sin embargo, es menos invasivo a las células dentro de un tejido de cartílago. De esta manera, la albúmina cationizada no es captada fácilmente por las células de la superficie del tejido de cartílago normal y virtualmente no se adsorbe en la matriz de cartílago presente dentro de la superficie del tejido de cartílago normal. Debido a esto, la albúmina cationizada es adsorbida intensivamente por una zona degenerativa (anormal) del tejido de cartílago articular. Para ser adsorbida intensivamente por una zona de cartílago dañada, una albúmina o un compuesto modificado/descompuesto de una albúmina preferiblemente está cargada, de tal modo que satisfice un punto isoeléctrico (pI) de 8 o más y de forma particularmente preferible de 10 o más. La seguridad de la composición de imagen de cartílago articular a aplicar a un cuerpo vivo puede potenciarse adicionalmente seleccionando una albúmina que es menos invasiva a las células de un tejido de cartílago, como se ha descrito anteriormente. Adicionalmente, si se selecciona una molécula de albúmina que presenta un peso molecular grande, se puede aumentar el número de marcadores (moléculas marcadoras). Por esta razón, si se usa, p.ej., una sustancia fluorescente como una molécula marcadora, se puede mejorar el brillo. Puesto que se puede realizar dicho control, la detección basada en una molécula marcadora, en otras palabras, la visualización, puede realizarse fácilmente.

Como compuesto que presenta una cadena de sacárido que va a ser cargado positivamente del mismo modo que la albúmina mencionada anteriormente y usado como molécula cargada positivamente de la presente invención, es preferible un compuesto lineal o cíclico que presente una cadena de sacárido. Como compuesto lineal que presenta una cadena de sacárido, es particularmente preferible el dextrano o un derivado de dextrano. Como compuesto cíclico que presenta una cadena de sacárido, es particularmente preferible la ciclodextrina o un derivado de ciclodextrina. Estos compuestos cargados positivamente, es decir, dextrano, ciclodextrina y un derivado de los mismos, se adsorben específicamente en la matriz de cartílago de forma similar a la albúmina mencionada anteriormente; sin embargo, son menos invasivos para las células de un tejido de cartílago. Por tanto, el dextrano y la ciclodextrina cationizados no son captados fácilmente por parte de las células desde la superficie del tejido de cartílago normal y virtualmente no se adsorben en la matriz de cartílago presente en la capa superficial del tejido de cartílago normal. Debido a esto, el dextrano o ciclodextrina cationizados se adsorben en una zona degenerativa (anormal) del tejido de cartílago articular. Para no realizar una invasión en las células del tejido de cartílago, el dextrano o la ciclodextrina preferiblemente presenta un peso molecular de 3.000 o más y más preferiblemente de 10.000 o más. La seguridad de la composición de imagen de cartílago articular a aplicar en un cuerpo vivo puede mejorarse adicionalmente seleccionando dextrano o ciclodextrina menos invasivos para las células de un tejido de cartílago, como se ha descrito anteriormente. Si se selecciona un dextrano o una ciclodextrina que tienen un peso molecular grande, se puede aumentar el número de moléculas marcadoras. Por esta razón, si por ejemplo se usa una sustancia fluorescente como molécula marcadora, se puede mejorar el brillo. Si se puede realizar dicho control, la detección basada en una molécula marcadora, en otras palabras, la visualización, se puede realizar fácilmente. Adicionalmente, en el caso de la ciclodextrina, puesto que se puede incluir fácilmente una molécula marcadora en la cavidad interior de la molécula, se puede obtener fácilmente la composición de imagen de cartílago articular de la presente invención.

Nótese que, en la presente invención, la “imagen de cartílago articular” se refiere a visualizar el estado del cartílago articular, en otras palabras, hacer que pueda verse el estado del cartílago articular a simple vista o a través de, p.ej., un dispositivo, con la ayuda de medios tales como imágenes, valores numéricos o vectores. La visualización incluye tanto la visualización (para la detección) de una muestra tomada de un tejido de cartílago articular y la visualización *in vivo* (*in situ*) (para detección) de un tejido de cartílago articular. Los ejemplos de visualización *in vivo* incluyen la visualización para cirugía común, la visualización para examen menos invasivo o la cirugía con un artroscopio y la visualización para examen menos invasivo llevada a cabo inyectando la composición de la presente invención en un espacio de la articulación por medio de, p.ej., una jeringa.

En la presente invención, la molécula marcadora se refiere a una molécula que se une directa o indirectamente a una molécula cargada positivamente, o que está incluida en una molécula cargada positivamente, marcando de este modo la molécula cargada positivamente y permitiendo la detección de la presencia de la molécula cargada positivamente a simple vista o mediante, p.ej., un dispositivo. Como molécula marcadora, que no está limitada de forma particular, se puede usar de forma apropiada, p.ej., una sustancia fluorescente, una molécula de anticuerpo, una molécula (molécula de reconocimiento de anticuerpo) que presente un sitio de reconocimiento reconocido por un anticuerpo específico, una partícula magnética, una partícula metálica o una nanopartícula metálica recubierta con vidrio.

Como realización de la presente invención, se usa preferiblemente una sustancia fluorescente como molécula marcadora debido a que se visualiza o detecta fácilmente. Como colorante fluorescente, se usa preferiblemente, p.ej., verde de indocianina, Alexa Fluor (marca registrada) 488, Alexa Fluor 546, Alexa Fluor 555, Alexa Fluor 568, Alexa Fluor 594, Alexa Fluor 647, BODIPY (marca registrada) FL, Texas Red (marca registrada), Oregon Green (marca registrada) 488, rodamina B, verde rodamina, tetrametil rodamina, fluoresceína, isotiocianato de fluoresceína,

ficoeritrina, ficocianina, Cy3, Cy5, Cy7. Entre ellos, el verde de indocianina es usado de forma particularmente preferible, debido a que es altamente seguro y se visualiza o detecta fácilmente. El verde de indocianina, que es irradiado con luz del infrarrojo cercano en las condiciones predeterminadas, emite fluorescencia que entra dentro de la región del infrarrojo y que tiene una longitud de onda mayor que la luz de infrarrojo cercano aplicada. La luz de emisión no puede ser reconocida virtualmente de forma directa a simple vista. Para la observación se requiere un dispositivo para detección de luz infrarroja; sin embargo, puesto que la observación se puede realizar en el campo oscuro, se puede controlar fácilmente el ajuste del contraste cuando se realiza la observación con un artroscopio, lo que facilita la detección. Dichas moléculas fluorescentes se usan para marcar una molécula cargada positivamente mediante el método de unión de avidina-biotina, inclusión u otros métodos conocidos en la técnica.

Cuando se usa una molécula de reconocimiento de anticuerpo como molécula marcadora, la fluorescencia se puede observar mediante el uso no solo del método de avidina-biotina, sino también mediante diversos tipos de reacciones de anticuerpo fluorescentes. Cuando se usa luciferina como molécula marcadora, se puede observar la emisión de luz que usa una reacción de luciferina-luciferasa. Como molécula marcadora, p.ej., se puede usar una sustancia que absorbe rayos-X, una nanopartícula magnética y una nanopartícula metálica. Si se usan éstas como molécula marcadora, la observación se puede realizar mediante TC de rayos-X, IRM, espectroscopía Raman o un método de resonancia de plasmón. Nótese que, además de la detección mediante la molécula marcadora mencionada anteriormente, la absorción de luz infrarroja de la hemoglobina presente de forma abundante bajo el tejido de cartílago y el fenómeno auto-luminoso de una fibra de colágeno se pueden evaluar de forma no invasiva. Asimismo, se puede evaluar de forma no invasiva la viscoelasticidad del tejido respecto a la tensión de cizalla mediante elastografía MR (MRE).

La composición de imagen de cartílago articular de la presente invención puede contener además componentes adicionales a las moléculas mencionadas anteriormente. Los ejemplos de componentes (aditivos) incluyen un agente isotónico, un tampón, un conservante y un antioxidante. Como agente isotónico, se usa preferiblemente, p.ej., cloruro sódico, glicerina, D-manitol, D-sorbitol o glucosa. Como tampón, cabe citar, p.ej., un tampón de fosfato, un tampón de acetato, un tampón de carbonato y un tampón de citrato.

La composición de imagen de cartílago articular de la presente invención puede contener, además de los aditivos mencionados anteriormente, una sustancia para prevenir adicionalmente la invasión de una molécula cargada positivamente en el tejido de cartílago. Como dicho material, por ejemplo, cabe mencionar colágeno y una albúmina no cargados positivamente o un derivado y producto de descomposición de los mismos.

Nótese que la composición de imagen de cartílago articular de la presente invención puede usarse en un sistema de administración de fármacos que se usa selectivamente a una zona dañada del cartílago, a través de la unión de un agente terapéutico que presente una acción reparadora de cartílago dañado o de una molécula de estructura tal como colágeno de tipo I que actúe como estructura, p.ej., para una lámina celular para medicina regenerativa y terapia celular en lugar de la molécula marcadora mencionada anteriormente, y también usarse en el control post-operatorio después de un trasplante de estructura.

A continuación, se describirá un método para usar la composición de imagen de cartílago articular de la presente invención. La composición de imagen de cartílago articular de la presente invención preferiblemente es una preparación líquida ya que un líquido puede aplicarse fácilmente. Cuando la composición de la presente invención se aplica dentro de un cuerpo vivo, se puede aplicar a una capa superficial de cartílago articular mediante spray, goteo o recubrimiento con un artroscopio, o mediante inyección en un espacio de la articulación. En caso de aplicación con un artroscopio, es preferible que la superficie de cartílago se lave, p.ej., con lactato de Ringer o suero fisiológico para eliminar el fluido mucoso (fluido sinovial) de un espacio de la articulación, y a continuación se aplica la composición de imagen de cartílago articular de la presente invención mediante pulverización o recubrimiento. Después de que la composición de imagen de cartílago articular se ha aplicado, p.ej., mediante pulverización, se deja que la composición de imagen de cartílago articular repose inmóvil durante un tiempo de penetración predeterminado. En la presente memoria, el tiempo predeterminado es específicamente, de forma preferible de aproximadamente 3 minutos a 30 minutos, más preferiblemente de aproximadamente 5 minutos a 20 minutos y aún más preferiblemente de aproximadamente 10 minutos a 15 minutos, en vista de la permeabilidad del tejido diana. Después de eso, el cartílago articular es lavado, p.ej., con lactato de Ringer para eliminar la adsorción no específica y el exceso de composición de imagen de cartílago articular. A continuación, p.ej., se detecta la fluorescencia de una molécula marcadora.

Como método de detección que usa una molécula marcadora, que no está limitada de forma particular, se emplea un método en el que se mide una molécula marcadora insertando un artroscopio y una fibra óptica que tiene un filtro que controla la luz de excitación para que sea adecuada para la molécula marcadora. Por ejemplo, cuando se usa un indicador fluorescente, verde de indocianina, como molécula marcadora, se puede observar fácilmente la fluorescencia verde (longitud de onda del máximo: de 800 a 850 nm) de verde de indocianina mediante imágenes de una cámara CCD a través de un filtro apropiado. Al pasar a imagen el resultado de detección, p.ej., la intensidad de fluorescencia puede convertirse, p.ej., en valores de color o numéricos deseados por el operario mediante el uso de un software apropiado, y presentarse. Adicionalmente, en una imagen visible de una zona degenerativa de cartílago visualizada con la composición de imagen de cartílago articular, como se ha mencionado anteriormente, si p.ej., se identifica o detecta la densidad de contraste y el cambio de color, se puede detectar la rugosidad de la superficie de tejido de cartílago degenerativo, más específicamente, el nivel de degeneración del cartílago. Puesto que el tiempo requerido

para la diagnosis o la cirugía con un artroscopio normalmente es corto, de 1 a 3 horas, es suficiente con que el tiempo de trabajo de la composición de imagen de cartílago articular sea de forma similar de aproximadamente 1 a 3 horas. Tras completar el diagnóstico o la cirugía, el lavado, p.ej., con lactato de Ringer o suero fisiológico se lleva a cabo una serie de veces. De este modo, la composición es casi descargada (eliminada). El residuo, si permanece, puede descomponerse, p.ej., mediante hidrólisis y ser descargado (eliminado).

Quando la composición de imagen de cartílago articular de la presente invención se aplica a un tejido de cartílago normal, la molécula cargada positivamente de la misma es rechazada por una estructura de tipo concha conformada por células lamelares y no puede realizar una invasión en las células del cartílago. Como resultado, el tejido de cartílago normal no se visualiza. Por el contrario, en el caso de tejido de cartílago degenerativo que no tiene una capa celular lamelar, la composición de imagen de cartílago articular es adsorbida en la matriz de cartílago expuesta de un modo orientado. Como resultado, el tejido de cartílago degenerativo es destacado. En un método de detección convencional, era difícil detectar e identificar la etapa inicial de la degeneración del cartílago, en otras palabras, "la degeneración de cartílago de grado 1" donde la capa de células lamelares acaba de ser eliminada. Sin embargo, la composición de imagen de cartílago articular de la presente invención posibilita la identificación y la detección de "degeneración de cartílago de grado 1" y permite una terapia temprana de los pacientes.

La composición de imagen de cartílago articular de la presente invención posibilita conocer el estado de daño del tejido (cartílago, ligamento cruzado y menisco) dentro de la articulación mediante el uso de un artroscopio, y tratar el daño, con el resultado de que se puede realizar un diagnóstico y un tratamiento menos invasivos. Hasta la fecha, una imagen de cartílago articular mostrada en un monitor por un artroscopio con luz visible se ve blanca y el nivel de brillo es elevado. Por esta razón, era difícil determinar la degeneración y el daño de una capa superficial de cartílago. Sin embargo, la degeneración y las zonas defectuosas de la superficie de un cartílago pueden ser marcadas mediante el uso de la composición de la presente invención, con el resultado de que se puede observar el estado de daño de un cartílago, que es difícil de observar con luz visible, permitiendo que una molécula marcadora emita fluorescencia infrarroja en un campo oscuro.

A continuación, se describirán los Ejemplos de la presente invención; no obstante, la presente invención no está limitada por dichos Ejemplos.

Ejemplos

Ejemplo 1

1. Preparación de albúmina cargada positivamente

Se disolvió una albúmina de suero bovino (producto fabricado por Sigma-Aldrich Co. LLC) (5 g) en agua pura (25 mL). De forma separada, se añadió etilendiamina anhidra (67 mL) (producto fabricado por Sigma-Aldrich Co. LLC) a agua pura (500 mL). A esto, se añadió gradualmente ácido clorhídrico 6N (aproximadamente 350 mL) para ajustar el pH a 4,75 en agua con hielo. A la disolución de etilendiamina resultante, se añadió hidrocloreuro de 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)-carbodiimida (1,8 g) (producto fabricado por Sigma-Aldrich Co. LLC.) y se añadió la disolución en agua de albúmina de suero bovino preparada anteriormente. La mezcla se agitó durante 2 horas mientras que el recipiente de preparación se enfriaba en agua con hielo para controlar la temperatura y el pH de la mezcla. La reacción se finalizó mediante la adición de tampón acetato 4 M (5 mL). La disolución resultante se dializó contra agua pura a 4°C durante 72 horas y a continuación se liofilizó. El cristal obtenido mediante liofilización era blanco y brillante y tenía una apariencia de tipo película fina.

El producto liofilizado preparado como se ha indicado anteriormente y la albúmina de suero bovino usada como materia prima fueron sometidos a medición de los puntos isoelectricos para comprobar si se había obtenido o no una albúmina cargada positivamente. El producto liofilizado y la albúmina de suero bovino fueron disueltos cada uno en agua pura, y aplicados a gel IEF Novex (marca registrada) (producto fabricado por Life Technologies Corporation) y sometidos a electroforesis de punto isoelectrico. Los resultados se muestran en la Figura 1. Tal como se muestra en la Figura 1, el pI de una albúmina de suero bovino normalmente es de aproximadamente 4,9; sin embargo, el pI del producto liofilizado fue de aproximadamente 11. De esto se deduce que el producto liofilizado estaba altamente cationizado. A partir de esto, se confirmó que se había obtenido una albúmina cargada positivamente.

Ejemplo 2

2. Investigación sobre la concentración óptima de albúmina cargada positivamente y verde de indocianina

Un colorante fluorescente, el verde de indocianina (ICG), no emite fluorescencia en el estado de disolución acuosa (que solo contiene ICG); sin embargo, el ICG emite fluorescencia dentro de la región del infrarrojo cercano cuando se une a una proteína. Se dejó que el ICG se uniera a la albúmina cargada positivamente preparada en el Ejemplo 1 y se midió la intensidad de fluorescencia emitida por el ICG como se indica a continuación. Nótese que también se midió la intensidad de fluorescencia emitida por el ICG cuando estaba unido a una albúmina no cargada positivamente, que sirvió como control.

La albúmina cargada positivamente preparada en el Ejemplo 1 se disolvió en agua pura para preparar disoluciones que tenían una concentración de 1,250 mg/mL, 0,625 mg/mL, 0,313 mg/mL, 0,156 mg/mL y 0,078 mg/mL. Por separado, se disolvió verde de indocianina (producto fabricado por Sigma-Aldrich Co. LLC.) en agua pura para preparar una disolución de 0,025 mg/mL. Se tomó una alícuota (50 µL) de cada una de las disoluciones de albúmina cargada positivamente de concentración diferente y de la disolución de ICG, se añadió a cada pocillo de una placa ELISA de 96 pocillos y se mezcló. Se midió la fluorescencia infrarroja emitida por la disolución resultante mediante un sistema de cámara de observación infrarroja (pde-neo C10935-20, fabricada por Hamamatsu Photonics K. K.) (luz de excitación: 760 nm, fluorescencia 830 nm). Se preparó un control del mismo modo que antes excepto en que se usó albúmina de suero bovino (producto fabricado por Sigma-Aldrich Co. LLC.) en lugar de la albúmina cargada positivamente, y se sometió al mismo test. Los resultados se muestran en la figura 2.

Tal como se muestra en la fotografía de la Figura 2, la fluorescencia procedente de la albúmina no cargada positivamente se pudo identificar en los gráficos experimentales que tenían una concentración de albúmina de 0,313 mg/mL (concentración de albúmina; 0,156 mg/mL, concentración de ICG; 0,0125 mg/mL) o más a simple vista. Por el contrario, la fluorescencia procedente de albúmina cargada positivamente pudo identificarse en los gráficos experimentales que tenían una concentración de albúmina de 0,156 mg/mL (concentración de albúmina cargada positivamente; 0,078 mg/mL, concentración de ICG; 0,0125 mg/mL) o más a simple vista. De esto se deduce que la fluorescencia puede identificarse en la albúmina cargada positivamente, que estaba en una concentración menor que una albúmina usada de forma general. Nótese que cuando se lleva a cabo un test añadiendo ICG a una concentración mayor que la concentración del test mencionado anteriormente (0,0125 mg/mL), se confirmó que el brillo de fluorescencia aumenta.

Ejemplo 3

3. Imagen (1) de modelo de daño de cartílago usando cartílago articular normal bovino mediante la composición de imagen de cartílago articular

Se escindió cartílago articular del hombro de la pata delantera de una ternera (de 2 a 3 semanas de edad) y se cortó en trozos de aproximadamente 1,5 cm x aproximadamente 2 cm de tamaño y se eliminó el hueso subcondral. Posteriormente, tal como se muestra en la ilustración de un modelo de daño de cartílago de la Figura 3, las superficies de los trozos de cartílago articular escindidas fueron cortadas parcialmente con una cuchilla a una profundidad de aproximadamente 0,1 a 0,2 mm para fabricar un defecto en la superficie del cartílago. En consideración del uso en zonas clínicas reales, se lavó cada uno de los trozos de cartílago articular pulverizando salino (aproximadamente 5 mL) mediante una jeringa. A continuación, se añadió gota a gota 200 µL de la composición de imagen de cartílago articular (concentración de albúmina cargada positivamente: 2,5 mg/mL, concentración de ICG: 0,125 mg/mL) preparada disolviendo una albúmina cargada positivamente e ICG en agua pura, sobre la superficie de una placa de plástico hidrofóbico, y el trozo de cartílago articular se colocó boca abajo sobre la superficie de la placa de plástico hidrofóbico para sumergir el trozo en la composición de imagen de cartílago articular. Aproximadamente de 10 a 15 minutos después, se lavó el exceso de composición de imagen de cartílago articular con salino. Las imágenes de trozos de cartílago articular individuales se tomaron con una cámara infrarroja (producto fabricado por Hamamatsu Photonics K. K.) y se registraron.

Las imágenes observadas mediante la cámara infrarroja se muestran en la Figura 3. En el trozo de cartílago articular (la superficie no ha sido escindida) del gráfico de control, la penetración y la adsorción de la composición de imagen de cartílago articular desde la superficie del cartílago no se confirmaron. Se observó una emisión en forma de línea blanca; sin embargo, se derivó de la unión del exceso de composición de imagen de cartílago articular por acción capilar hacia la superficie del lado periférico exterior del trozo de cartílago articular. Por el contrario, en el gráfico experimental 1 (una media porción de una de las superficies del cartílago fue escindida con una cuchilla para fabricar un defecto), se confirmó la emisión de luz derivada de la composición de imagen de cartílago articular, que penetró a través del defecto de la superficie y se adsorbió. Nótese que se observó una emisión como una línea blanca; sin embargo, se derivó del exceso de composición de imagen de cartílago articular adsorbida por acción capilar en la superficie del lado periférico exterior del trozo de cartílago articular. En el gráfico experimental 2 (una porción central de una de las superficies de cartílago con una cuchilla), se confirmó la emisión de luz derivada de la composición de imagen de cartílago articular, que penetró desde la porción de defecto de la superficie central y se adsorbió. Como se ha descrito anteriormente, se demostró que, en la superficie escindida, la composición de imagen de cartílago articular de la presente invención penetra hasta la profundidad, se adsorbe ahí y emite una fluorescencia intensa.

Ejemplo 4

4. Imagen (2) de modelo de daño de cartílago usando cartílago articular normal bovino mediante la composición de imagen de cartílago articular

Se escindió asépticamente cartílago articular del hombro de la pata delantera de una ternera (de 2 a 3 semanas de edad) y se cortó en trozos de aproximadamente 1 cm x aproximadamente 1,5 cm de tamaño, y se eliminó el hueso subcondral en la medida de lo posible. Los cartílagos escindidos fueron sumergidos en un tampón de fosfato fisiológico. Posteriormente, casi la mitad de la superficie (la mitad derecha vista desde arriba) de cada uno de los trozos de cartílago articular fue cortada con un escalpelo (nº 11) hasta una profundidad de aproximadamente 0,1 a 0,2 mm para

formar un defecto en la superficie del cartílago. Debido al tratamiento, la mitad izquierda (vista desde arriba) del trozo de cartílago articular permanece intacta y se usa como gráfico de control; mientras que la mitad derecha (vista desde arriba) se usa como modelo de daño superficial de cartílago. Para confirmar la posición de la medición y la observación, se cortó diagonalmente una de las esquinas de la superficie dañada. Antes de la observación de fluorescencia, se pulverizó un tampón de fosfato fisiológico (aproximadamente de 2 a 3 mL) en cada uno de los trozos de cartílago articular mediante una jeringa y se lavó. El exceso de tampón se eliminó con Kimwipe (marca registrada). A continuación, se añadieron gota a gota las siguientes disoluciones de muestra 1 a 4 (50 µL de cada) a las respectivas placas petri hidrofóbicas, y el trozo de cartílago articular se colocó cara abajo sobre la disolución de muestra añadida gota a gota sobre la superficie de la placa petri hidrofóbica para impregnar la superficie del trozo de cartílago articular con la disolución de muestra. Aproximadamente 10 minutos después, el exceso de disolución de muestra se lavó con un tampón de fosfato fisiológico y el exceso de tampón se eliminó con Kimwipe. Cada uno de los trozos de cartílago articular se colocó sobre un trozo de papel negro y se fotografió con luz de infrarrojo cercano y con luz visible.

Las disoluciones de muestra 1 a 4 usadas en este ejemplo se prepararon disolviendo de forma separada los componentes individuales en agua pura. La disolución de muestra 1 solo contenía agua pura; la disolución de muestra 2 contenía ICG en una concentración de 0,125 mg/mL; la disolución de muestra 3 contenía una albúmina en una concentración de 2,5 mg/mL e ICG en una concentración de 0,125 mg/mL; y la disolución de muestra 4 contenía una albúmina cargada positivamente en una concentración de 2,5 mg/mL e ICG en una concentración de 0,125 mg/mL. En la filmación con luz de infrarrojo cercano, cada una de las disoluciones de muestra de los trozos de cartílago articular fue excitada con una fuente de luz (longitud de onda de excitación: 770 nm, 30 mA para cada una), que se preparó disponiendo 16 diodos emisores de luz de infrarrojo cercano en forma de círculo, y las imágenes se tomaron con una cámara CCD de alta sensibilidad (ORCA-ER, fabricada por Hamamatsu Photonics K. K.) con un filtro para ICG (832 nm) (BrightLine ICG-B, fabricado por Semrock) todas en las mismas condiciones (100 ms, luz baja y modo "binning" 8 x). Tras la filmación con luz de infrarrojo cercano, se llevó a cabo una filmación monocroma con luz visible.

Los resultados se muestran en la Figura 4. En cada una de las fotografías tomadas con luz visible y luz de infrarrojo cercano, la mitad izquierda muestra un control intacto y la mitad derecha muestra un modelo de daño. En el caso de la disolución de muestra 1 (solo agua pura), se confirmó que no se emite luz desde ambas superficies. Sin embargo, en la disolución de muestra 2 (solo ICG), se emitió fluorescencia desde el control intacto. Posiblemente, la fluorescencia derivó de ICG adsorbido en una proteína de la superficie del cartílago. Por el contrario, no se observó fluorescencia en el modelo de daño. Esto se consideró que cuando la superficie del cartílago está dañada, la cadena de sacárido, tal como glicosaminoglicano, es expuesta en la superficie del cartílago en una mayor proporción que las proteínas, y por tanto el ICG no se adsorbe en dichas cadenas de sacárido. Por el contrario, en la muestra de disolución 3 (albúmina + ICG), se emitió una fluorescencia extremadamente débil desde ambas superficies; sin embargo, no hubo diferencia en la intensidad de emisión entre ellas. De esto se deduce que una albúmina virtualmente no tiene ninguna especificidad de adsorción a la matriz de cartílago y a una capa celular, y se considera que la albúmina contenida en una disolución de muestra se une a ICG, y por tanto el ICG pierde la actividad de adsorción a proteínas de la superficie del cartílago. En el caso de la disolución de muestra 4 (albúmina cargada positivamente + ICG), se observó que se emitía una fluorescencia intensa desde la superficie dañada. A partir de esto se supone que una albúmina cargada positivamente penetra a través de una superficie dañada hacia el interior y se adsorbe en una capa intermedia de cartílago que contiene una cantidad grande de carga negativa. En la superficie de control intacta, las capas celulares están dispuestas densamente y la cantidad de carga negativa es baja. A partir de esto, se considera que la cantidad de albúmina cargada positivamente que se adsorbe es baja. El ICG estaba saturado con proteínas debido a la inclusión de una albúmina cargada positivamente y posiblemente no recién adsorbido a proteínas de la superficie del cartílago. Como se ha descrito anteriormente, se demostró que la composición de imagen de cartílago articular de la presente invención constituida por una albúmina cargada positivamente e ICG, penetra en la porción dañada del cartílago, se adsorbe y emite fluorescencia de forma más intensa que una porción de superficie de cartílago normal para visualizar la porción dañada.

Ejemplo 5

5. Imagen de cartílago humano dañado con la composición de imagen de cartílago articular

Se llevó a cabo la obtención de imágenes de una porción dañada de cartílago articular humano con la composición de imagen de cartílago articular de la presente invención. Como material de ensayo, se usó cartílago degenerativo de artritis humana, que se tomó de una escisión de residuo médico de una cirugía de articulación de la rodilla artificial. El cartílago articular fue escindido asépticamente y cortado en trozos de aproximadamente 1 cm x aproximadamente 1,5 cm de tamaño. El cartílago escindido se sumergió en un tampón de fosfato fisiológico. Antes de la observación de fluorescencia, se pulverizó un tampón fisiológico de fosfato (de aproximadamente 2 a 3 mL) sobre los trozos de cartílago articular mediante una jeringa y se lavó, y a continuación se tomaron fotografías a color con luz visible. El exceso de tampón se eliminó con Kimwipe (marca registrada). A continuación, 100 µL de una composición de imagen de cartílago articular (concentración de albúmina cargada positivamente: 2,5 mg/mL, concentración de ICG: 0,125 mg/mL) preparada disolviendo una albúmina cargada positivamente e ICG en agua pura, se colocaron en una placa petri hidrofóbica y el trozo de cartílago articular se colocó cara abajo sobre la placa petri para impregnar la superficie del trozo de cartílago articular con la composición de imagen de cartílago articular. Aproximadamente 10 minutos después, se lavó el exceso de composición de imagen con un tampón de fosfato fisiológico (de 2 a 3 mL) y el exceso

de tampón se eliminó mediante Kimwipe. Cada uno de los trozos de cartílago articular se colocó sobre un trozo de papel negro, y la superficie superior y la superficie lateral fueron fotografiadas con luz de infrarrojo cercano. Para la filmación con luz de infrarrojo cercano, la disolución de muestra de cada uno de los trozos de cartílago articular fue excitada con una fuente de luz (longitud de onda de excitación: 770 nm, 30 mA para cada uno), que se preparó disponiendo 16 diodos emisores de luz de infrarrojo cercano en forma de círculo, y se tomaron imágenes mediante una cámara CCD de alta sensibilidad (ORCA-ER, fabricada por Hamamatsu Photonics K. K.) mediante un filtro para ICG (832 nm) (BrightLine ICG-B, fabricado por Semrock) todas en las mismas condiciones (100 ms, luz baja y modo de "binning" 8 x, modo auto-contraste).

Los resultados se muestran en la Figura 5. Puesto que el cartílago degenerativo humano usado en el ejemplo presentaba una osteoartritis severa, se emitió una fluorescencia intensiva en prácticamente todos los trozos de cartílago articular. De esto se deduce que en la composición que contenía una albúmina cargada positivamente e ICG, la albúmina cargada positivamente suprime la adsorción no específica de ICG a una proteína biológica, se adsorbe preferentemente en la carga negativa presente de forma abundante en la capa intermedia del cartílago y emite fluorescencia. Nótese que, tal como se muestra en la Figura 5, se observó que se emitía fluorescencia desde una porción roja delgada de una superficie de trozo de cartílago y se confirmó que cuando la observación se realiza con luz visible la intensidad es baja en comparación con la porción periférica de la misma. Dato que la porción roja delgada es un tejido próximo al borde del cartílago articular, se consideró que la porción era un tejido que contenía un vaso sanguíneo como un tejido sinovial formado en la superficie del cartílago, y que el tejido sinovial supuestamente retrasó la penetración de la composición de imagen de la presente invención.

Aplicabilidad industrial

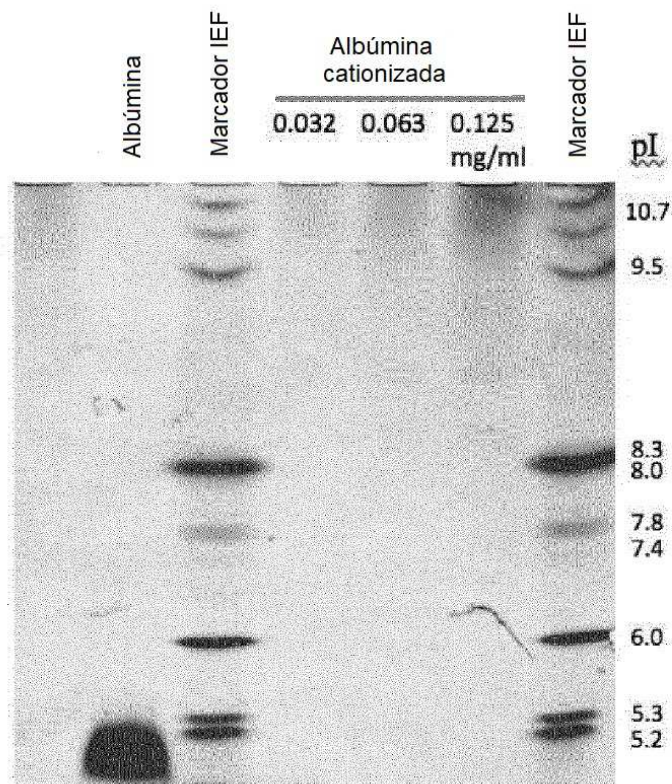
La composición de imagen de cartílago articular de la presente invención permite una detección temprana de la degeneración del cartílago, que es una causa de activación de la osteoartritis de rodilla, y la identificación definida de la frontera entre cartílago normal y cartílago degenerativo. La composición de imagen de cartílago articular de la presente invención no solo puede visualizar una zona degenerativa en cartílago articular *in vivo*, p.ej., para diagnóstico o cirugía con un artroscopio, sino también visualizar de forma no invasiva o menos invasiva el estado degenerativo del cartílago mediante la inyección de la composición de imagen de cartílago articular de la presente invención en un espacio de la articulación, y se puede observar el estado degenerativo usando una técnica de imagen *in vivo*. Adicionalmente, la composición de imagen de cartílago articular de la presente invención es útil para evaluar el grado de daño del cartílago, y el grado de mejoría, y en investigación de nuevos fármacos y en investigación patológica de enfermedades de cartílago articular, en tejidos de cartílago articular escindidos o en tejidos de cartílago articular regenerados.

REIVINDICACIONES

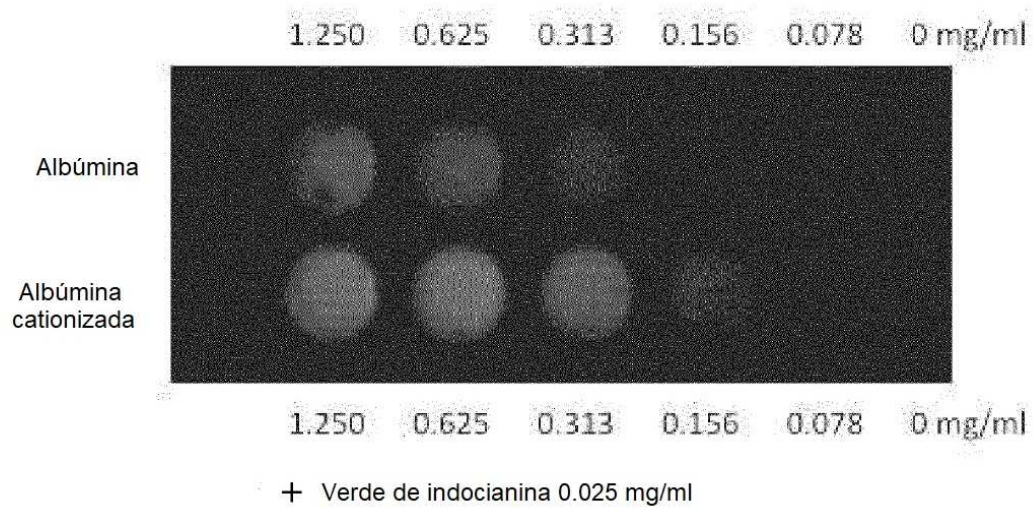
1. Una composición adecuada para uso en la visualización de una zona degenerativa de cartílago articular, que se caracteriza por contener una albúmina cargada positivamente marcada con verde de indocianina.

5 2. Una composición adecuada para uso en la visualización de una zona degenerativa de cartílago articular según la reivindicación 1, donde la zona degenerativa del cartílago articular presenta una capa dañada de un tejido de cartílago o presenta una porción defectuosa desde la capa superficial hacia la porción profunda de un tejido de cartílago.

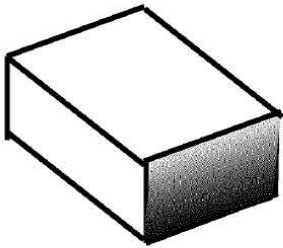
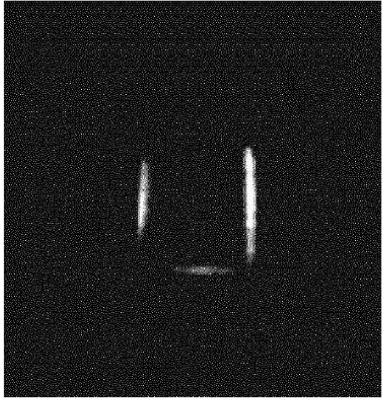
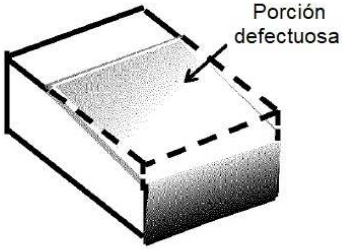
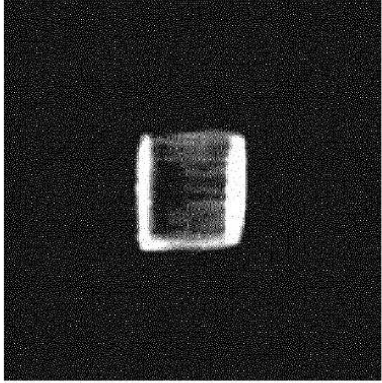
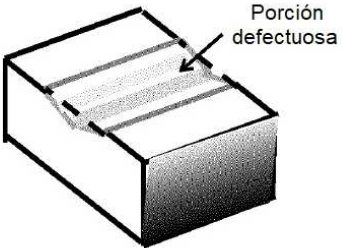
[Figura 1]



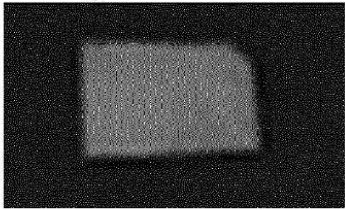
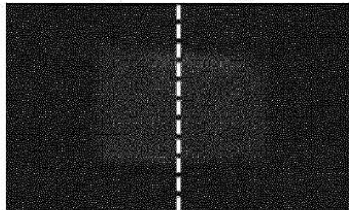
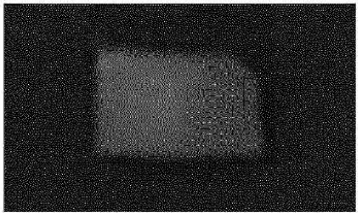
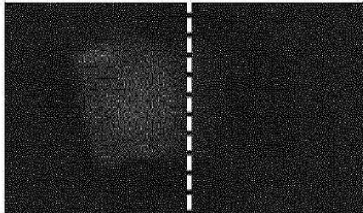
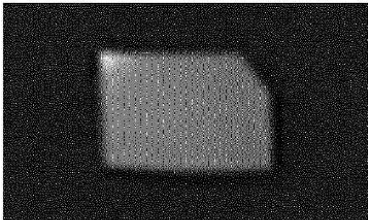
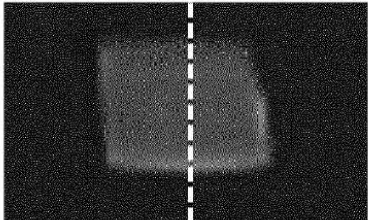
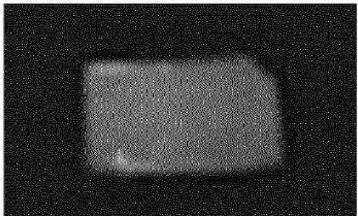
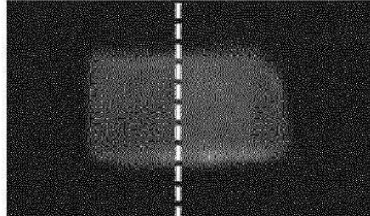
[Figura 2]



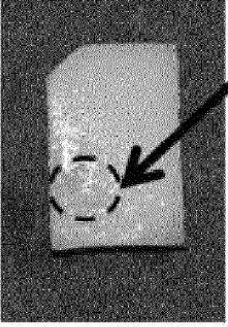
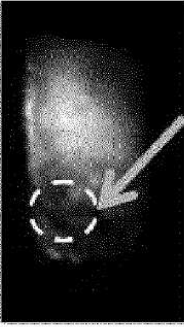
[Figura 3]

	Modelo de daño de cartílago	Imagen tomada con cámara infrarrojos
Gráfico de control (intacto)		
Gráfico ensayo 1 (defecto media superficie)		
Gráfico ensayo 2 (defecto porción central)		

[Figura 4]

	Imagen con luz visible	Imagen con luz infrarrojo cercano
Solo agua pura	Intacto Dañado 	Intacto Dañado 
Solo ICG		
Albúmina + ICG		
Albúmina cargada positivamente + ICG		

[Figura 5]

Imagen con luz visible	Imagen con luz de infrarrojo cercano	
Superficie superior	Superficie superior	Superficie lateral
 Porción roja delgada	 Porción roja delgada	