

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 957 219**

51 Int. Cl.:

A61K 48/00 (2006.01)

A61K 31/722 (2006.01)

A61K 31/711 (2006.01)

A61K 9/00 (2006.01)

A61K 47/36 (2006.01)

A61K 47/40 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **29.12.2016** **PCT/KR2016/015507**

87 Fecha y número de publicación internacional: **01.03.2018** **WO18038331**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **29.12.2016** **E 16914310 (4)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **02.08.2023** **EP 3505189**

54 Título: **Composición para inyección en cavidad articular que comprende un ácido nucleico y quitosano**

30 Prioridad:

25.08.2016 KR 20160108582

26.12.2016 KR 20160179457

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
15.01.2024

73 Titular/es:

PHARMARESEARCH CO., LTD. (100.0%)
77-19, Gwahakdanji-ro
Gangneung-si, Gangwon-do 25452, KR

72 Inventor/es:

KIM, IK SOO;
KIM, HAN GYU y
LEE, SU YEON

74 Agente/Representante:

ELZABURU, S.L.P

ES 2 957 219 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 para inyección en cavidad articular que comprende un ácido nucleico y quitosano

Campo técnico

La presente invención se refiere a una composición que contiene un ácido nucleico y quitosano para inyección intraarticular.

Antecedentes

Una articulación es un lugar donde se unen un hueso y otro hueso y una fina capa de cartílago vítreo, llamado cartílago articular, está colocada en las caras enfrentadas de dos huesos que constituyen la articulación. La periferia de una articulación está cubierta por una membrana de tejido conectivo en forma de periostio continuo, por lo que se denomina cápsula articular, y la luz de la cápsula articular se denomina cavidad articular. Una membrana delgada llamada membrana sinovial se encuentra en la superficie interna de la cavidad articular y se libera constantemente una pequeña cantidad de líquido sinovial en la cavidad articular para suavizar los movimientos articulares.

Las enfermedades articulares se producen cuando surgen problemas en dicha articulación y, de las enfermedades articulares, la enfermedad más frecuente es la osteoartritis. La osteoartritis invade principalmente los dedos, las rodillas, las articulaciones de la cadera y la columna lumbar, y el dolor y la restricción del movimiento son síntomas comunes representativos, aunque dichos síntomas varían ligeramente según la articulación invadida por la osteoartritis. La terapia de la osteoartritis tiene como objetivo minimizar la discapacidad mitigando los dolores y mejorando y manteniendo el movimiento articular (Lee Choong-Ki, 2000).

La osteoartritis es una enfermedad crónica y requiere tratamiento a largo plazo debido al aumento de la esperanza de vida. La elección del tratamiento se divide en gran medida en tratamiento conservador no farmacológico, farmacoterapia y tratamiento quirúrgico, y el régimen terapéutico debe establecerse por separado según la gravedad y duración de los síntomas, los hallazgos radiológicos, la edad y la enfermedad acompañante, el estilo de vida, el nivel socioeconómico, actividad previa al inicio y parámetros similares de un paciente. (Lee S. C., et al., 2010; y Yoon J. P., et al., 2012).

A diferencia de otras enfermedades de las articulaciones, la artrosis es una enfermedad que permite la administración intraarticular de fármacos. El ácido hialurónico (HA), que es un polisacárido, es uno de los componentes importantes del líquido sinovial articular. La presencia de ácido hialurónico contribuye a la viscoelasticidad del líquido sinovial, permitiendo que el líquido sinovial actúe como lubricante y amortiguador (Balazs E. A., et al., 1993). Además, el ácido hialurónico que tiene un alto peso molecular tiene una acción antiinflamatoria y una acción analgésica en las articulaciones inflamatorias (Kikuchi T., et al., 1996; Yoshimi T., et al., 1994; Sakakibara Y., et otros, 1994). Por lo tanto, la administración intraarticular de ácido hialurónico ha sido actualmente aprobada y se utiliza en varios países para el tratamiento de la osteoartritis.

La administración intraarticular de fármaco tiene la ventaja de alcanzar concentraciones adecuadas del fármaco incluso en dosis bajas y minimizar los efectos secundarios sistémicos. Sin embargo, los fármacos administrados en el líquido sinovial se retienen durante un tiempo muy corto y, por lo tanto, se requiere el desarrollo de formulaciones de liberación sostenida capaces de liberar el fármaco de forma sostenida en las articulaciones (Gerwin N., et al., 2006).

Por lo tanto, los presentes inventores verificaron un efecto de mitigación del dolor de la cavidad articular y un efecto de regeneración del cartílago inyectando una composición que contiene un ácido nucleico y quitosano mientras estudiaban una composición para inyección intraarticular, y así pudieron completar la presente invención.

La Publicación de Patente Japonesa No. 2010-531863 como técnica anterior describe una preparación de tipo gel para inyección intraarticular, la preparación contiene ácido hialurónico y al menos un tipo de otro polisacárido derivado de la naturaleza. Por lo tanto, dicha técnica anterior tiene constituyentes similares a los de la presente invención, pero no describe un ácido nucleico. Además, la Publicación de Patente China No. 104546691 describe una composición termosensible de gel in situ para inyección intraarticular, composición de gel que contiene quitosano. Por lo tanto, dicha técnica anterior tiene constituciones similares a la presente invención, pero es diferente de la presente invención en que dicha técnica anterior no describe un ácido nucleico. La Publicación de Utilidad Coreana No. 20-2009-0011604 describe una inyección intraarticular que contiene ácido hialurónico, pero es diferente de la presente invención en que dicha técnica anterior no describe un ácido nucleico ni quitosano.

El documento WO 98/17321 A1 se relaciona con métodos para la administración y expresión de genes en áreas que actualmente son inaccesibles mediante el uso de técnicas convencionales de administración directa de proteínas. En particular, los métodos y productos relacionados proporcionados en el mismo se pueden usar en el tratamiento de trastornos relacionados con la alfa 1 antitripsina (AAT), tales como la infección por el virus respiratorio sincitial (RSV).

Zhang X et al.: "Direct chitosan-mediated gene delivery to the rabbit knee joints in vitro and in vivo", Biochemical and Biophysical Research Communications, Elsevier, Amsterdam, NL, vol. 341, núm. 1, 3 de marzo de 2006 (2006-03-03), páginas 202-208, XP026234706, ISSN: 0006-291X, DOI:10.1016/J.BBRC.2005.12.171 se relaciona con la confirmación de que se pueden transferir genes extraños a condrocitos articulares en cultivo primario y la clarificación de la disponibilidad de transferencia in vivo de los vectores de quitosano mediante la inyección directa de nanopartículas de ADN de quitosano que contienen el gen IL-1Ra o IL-10 en las cavidades de la articulación de la rodilla de conejos con osteoartritis. Se detectó una clara expresión de IL-1Ra en el líquido sinovial de la articulación de la rodilla del grupo inyectado con quitosano IL-1Ra. Si bien no se detectó expresión en el grupo inyectado con quitosano IL-10, esto demuestra que la eficiencia de transfección de las nanopartículas de ADN de quitosano estaba estrechamente relacionada con el tipo de producto genético. También se observó una reducción significativa en la gravedad de las lesiones histológicas del cartílago en el grupo que recibió la inyección de quitosano IL-1Ra. Por tanto, esta vía puede representar un tratamiento futuro prometedor para la osteoartritis.

El documento WO 2013/070010 A1 se refiere a una composición farmacéutica para la administración de genes, que comprende: (i) un gen; (ii) un quitosano soluble en agua; (iii) un pirofosfato de tiamina o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo; (iv) una protamina o una sal farmacéuticamente aceptable de la misma; y (v) un fosfolípido neutro o aniónico. La composición puede introducir un gen en las células de forma segura y eficaz. Compuesta por componentes no tóxicos e inyectables, la composición es segura para el organismo y puede comercializarse ventajosamente. En particular, puede administrar un gen con alta eficacia tanto in vivo como in vitro, y es estable en la sangre.

El documento US 2011/059162 A1 describe una composición que comprende una matriz de quitosano y un tanino en donde el quitosano está enlazado electrostáticamente al tanino para formar un material compuesto de quitosano-tanino. El quitosano puede estar parcial o totalmente desacetilado, y el tanino puede ser una proantocianidina monomérica u oligomérica o un tanino hidrolizable. El material compuesto de quitosano-tanino puede ser una nanopartícula, una película de hidrogel, una bioespuma o un biogel, o el material compuesto de quitosano-tanino puede recubrir un liposoma. Los materiales compuestos se pueden usar para la administración de fármacos, para aplicaciones antibacterianas y/o antifúngicas, para aplicaciones de ingeniería de tejidos, para aplicaciones de curación de heridas, o se pueden usar como adyuvantes para vacunación, incluidas vacunas orales. La invención también proporciona métodos para preparar los materiales compuestos y sus diversas formas.

Descripción detallada de la invención

Problema técnico

Un aspecto de la presente invención es proporcionar una composición que contiene un ácido nucleico y quitosano para inyección intraarticular, en donde el contenido del ácido nucleico es del 0,1 al 3% en peso con respecto al peso total de la composición, el contenido del quitosano es 0,001-0,1% en peso con respecto al peso total de la composición, y la relación en peso del ácido nucleico y el quitosano es de 1:1 a 3000:1.

Solución técnica

La presente invención está dirigida a una composición para inyección intraarticular, la composición que contiene un ácido nucleico y quitosano, en donde el contenido del ácido nucleico es del 0,1 al 3% en peso con respecto al peso total de la composición, el contenido del quitosano es 0,001-0,1% en peso con respecto al peso total de la composición, y la relación en peso del ácido nucleico y el quitosano es de 1:1 a 3000:1.

El ácido nucleico puede ser ácido desoxirribonucleico (ADN), ácido ribonucleico (ARN) o una mezcla de los mismos. Preferiblemente, el ácido nucleico puede ser ácido desoxirribonucleico (ADN).

El ácido desoxirribonucleico puede seleccionarse entre oligonucleótidos, polinucleótidos y polidesoxirribonucleótidos.

El ácido nucleico puede tener un peso molecular de 1-100.000 kDa. El ácido nucleico puede tener un peso molecular de preferentemente 10-10.000 kDa, y más preferentemente de 50-3.500 kDa.

El quitosano puede tener un peso molecular de 3-1.000 kDa.

La composición puede contener un polímero soluble en agua como ingrediente adicional.

El polímero soluble en agua puede ser al menos uno seleccionado del grupo que consiste en ácido hialurónico, sulfato de condroitina, glucógeno, dextrina, dextrano, sulfato de dextrano, hidroxipropilmetilcelulosa, ácido alginico, quitina, pululano, colágeno, gelatina, hidrolizados de todos los anteriores, poli(alcohol vinílico), polivinilpirrolidona, poli(ácido acrílico) y polímeros carboxivinílicos. Preferiblemente, el polímero soluble en agua puede ser ácido hialurónico.

La composición puede ser un hidrogel, del cual se produce una transición sol-gel dependiente de la temperatura.

La inyección intraarticular puede ser una administración para al menos un síntoma seleccionado del grupo que consiste en hernia del núcleo pulposo, hombro congelado, síndrome de pinzamiento, síndrome del túnel carpiano, artritis degenerativa, codo de tenista/golfista, síndrome de dolor regional complejo, otros síntomas de tendinitis y reumatismo articular crónico.

5 A continuación, la presente invención se describirá en detalle.

La composición que contiene un ácido nucleico y quitosano para inyección intraarticular se puede preparar comprendiendo las etapas de i) colocar un ácido nucleico en una solución tampón y disolver el ácido nucleico en la solución tampón durante 30 minutos a 1 hora con agitación a 40- 70 °C, para preparar una solución madre de ácido nucleico; ii) disolver quitosano en una solución tampón ácida para preparar una solución madre de quitosano; iii) 10 mezclar la solución madre de ácido nucleico de la etapa i) y la solución madre de quitosano de la etapa ii) de modo que la relación en peso del ácido nucleico y el quitosano sea de 1:1 a 3000:1, seguido de agitación a 40-70 °C durante 30 minutos a 1 hora; y iv) reducir la temperatura de la mezcla líquida de ácido nucleico y quitosano en la etapa iii) a temperatura ambiente con agitación.

La solución tampón utilizable en la preparación de la solución madre de ácido nucleico puede ser fosfato sódico 15 dibásico dodecahidrato, cloruro sódico, cloruro de magnesio, cloruro potásico, solución salina tampón de fosfato o solución tampón de ácido N-(2-hidroxietil)-piperazina-N'-2-etanosulfónico (HEPES), preferiblemente fosfato sódico dibásico dodecahidrato, y lo más preferiblemente fosfato sódico dibásico dodecahidrato 5-300 mM, pero sin limitación.

La solución tampón ácida utilizable en la preparación de la solución madre de quitosano puede ser ácido acético, ácido clorhídrico, ácido ascórbico, ácido láctico, ácido nítrico, ácido glutámico o ácido fórmico, preferiblemente ácido acético 20 y lo más preferiblemente ácido acético 10-300 mM, pero no se limita a los mismos.

La composición que contiene un ácido nucleico y quitosano para inyección intraarticular puede ser un hidrogel termosensible, del cual se produce una transición sol-gel dependiente de la temperatura.

Por hidrogel termosensible se entiende un hidrogel en donde, dependiendo de la temperatura, se produce una transición de fase de sol a gel o de gel a sol. La transición de un sol a gel se denomina gelificación. La gelificación en 25 la presente invención se define como un estado en donde un polímero que tiene viscoelasticidad forma una estructura de red tridimensional al aumentar la temperatura y, por tanto, permanece sin disolverse en un disolvente.

La composición para inyección intraarticular que tiene propiedades de un hidrogel termosensible se inyecta en una cavidad articular para que la temperatura corporal restablezca la viscoelasticidad y, como resultado, la composición se gelifica y, por tanto, se retrasa la velocidad de degradación de la composición y el tiempo de retención de la 30 composición aumenta en la cavidad articular, protegiendo así una articulación y promoviendo un efecto de restauración de los tejidos de cartílago dañados a través de acciones lubricantes continuas y de absorción de impactos.

La composición que contiene un ácido nucleico y quitosano para inyección intraarticular se mantiene en un estado homogéneo y tiene una alta estabilidad sin separación de capas, y el ácido nucleico y el quitosano tienen una relación en peso de 1:1 a 3000:1. La relación en peso de los mismos es preferiblemente de 10:1 a 300:1, y lo más 35 preferiblemente de 10:1 a 100:1.

El contenido del ácido nucleico es del 0,1 al 3% en peso, y preferiblemente del 1 al 2% en peso, con respecto al peso total de la composición.

El ácido nucleico puede tener un peso molecular de 10-100.000 kDa, preferiblemente 10-10.000 kDa y lo más preferiblemente 50-3.500 kDa. Un ácido nucleico que tiene un peso molecular inferior a 10 kDa hace imposible 40 controlar la velocidad de degradación del gel, y un ácido nucleico que tiene un peso molecular superior a 100.000 kDa hace difícil controlar la viscosidad del gel y, por tanto, el uso de la composición es problemático.

El ácido nucleico puede ser ácido desoxirribonucleico (ADN), ácido ribonucleico (ARN) o una mezcla de los mismos, y preferiblemente ácido desoxirribonucleico.

Además, el ácido desoxirribonucleico puede incluir oligonucleótidos, polinucleótidos y polidesoxirribonucleótidos.

Además, el contenido de quitosano es del 0,001 al 0,1% en peso, preferiblemente del 0,01 al 0,1% en peso con 45 respecto al peso total de la composición.

El peso molecular del quitosano es preferiblemente de 3 a 1.000 kDa, pero no se limita a dicho intervalo.

La mezcla del ácido nucleico y quitosano se realiza de manera que la relación en peso del ácido nucleico y el quitosano sea de 1:1 a 3000:1. En este caso, es preferible que el contenido del ácido nucleico sea del 0,1 al 3% en peso con 50 respecto al peso total de la composición y el contenido de quitosano sea del 0,001 al 0,1% en peso con respecto al peso total de la composición.

La composición que contiene un ácido nucleico y quitosano para inyección intraarticular puede contener un polímero soluble en agua como ingrediente adicional.

El polímero soluble en agua se puede agregar para controlar la velocidad de degradación de la composición que contiene un ácido nucleico y quitosano para inyección intraarticular y asegurar una acción lubricante y efectos terapéuticos de la misma.

5 El polímero soluble en agua es uno que puede disolverse o degradarse in vivo, y ejemplos del mismo pueden incluir: polisacáridos, tales como ácido hialurónico, sulfato de condroitina, glucógeno, dextrina, dextrano, sulfato de dextrano, hidroxipropilmetilcelulosa, ácido algínico, quitina y pululano; proteínas, tales como colágeno, gelatina e hidrolizados de las mismas; y compuestos poliméricos sintéticos, tales como poli(alcohol vinílico), polivinilpirrolidona, poli(ácido acrílico) y polímeros carboxivinílicos, y un ejemplo preferible de los mismos es el ácido hialurónico.

10 La composición que contiene un ácido nucleico y quitosano para inyección intraarticular, que contiene el polímero soluble en agua como aditivo adicional, puede ser una en la que se mezclan ácido nucleico, quitosano y un polímero soluble en agua en una proporción en peso de 1-3000:1:1-3000. La relación en peso de los mismos es preferiblemente 10-1.000:1:10-1.000 y más preferiblemente 25-100:1:25-100.

El ácido hialurónico incluye una forma lineal o reticulada, y su peso molecular puede ser de 20 a 10.000 kDa, y preferiblemente de 500 a 3.000 kDa, pero no se limita a dichos intervalos.

15 La composición que contiene un ácido nucleico y quitosano para inyección intraarticular puede mitigar el dolor en una cavidad articular, reducir la inflamación e inducir la regeneración del cartílago mediante su inyección intraarticular.

20 La composición que contiene un ácido nucleico y quitosano para inyección intraarticular se puede administrar para al menos un síntoma seleccionado del grupo que consiste en hernia del núcleo pulposo, hombro congelado, síndrome de pinzamiento, síndrome del túnel carpiano, artritis degenerativa, codo de tenista/golfista, síndrome de dolor regional complejo, otros síntomas de tendinitis y reumatismo articular crónico.

Efectos ventajosos

25 La presente invención está dirigida a una composición que contiene un ácido nucleico y quitosano para inyección intraarticular. Más específicamente, se verificó que una composición para inyección intraarticular preparada mezclando un ácido nucleico y quitosano es biocompatible y permite que se produzca una transición sol-gel dependiente de la temperatura. Además, se verificó que la inyección de la composición de la presente invención aumenta la biosíntesis de proteoglicanos para lograr la restauración de los tejidos cartilaginosos, lo que conduce a una reducción del dolor, mejorando así la velocidad de la marcha y la longitud de la zancada involucrada en el movimiento articular.

30 Por lo tanto, se espera que la composición para inyección intraarticular de la presente invención sea inyectable en cavidades articulares que necesitan alivio del dolor y terapia y la gelificación de la composición inyectada en la cavidad articular reduce la degradación de la composición y aumenta el tiempo de retención de fármacos, exhibiendo así un efecto restaurador suficiente de los tejidos del cartílago en la cavidad articular a través de acciones lubricantes y amortiguadoras continuas, lo que conduce a excelentes efectos terapéuticos.

Breve descripción de los dibujos

35 La FIG. 1 ilustra los resultados que confirman las condiciones físicas de las composiciones para inyección intraarticular de la presente invención. Se preparó cada composición para inyección intraarticular y luego se dejó durante tres días y posteriormente se investigó la transparencia, la formación de precipitados y la separación de capas de la composición.

40 La FIG. 2 muestra los resultados que confirman la formación de un hidrogel, del cual se produce una transición sol-gel dependiente de la temperatura de la composición para inyección intraarticular del Ejemplo 1-1 de la presente invención.

La FIG. 3 muestra los resultados que confirman la biocompatibilidad mediante la presencia o ausencia de una reacción de inflamación mediante la administración de las composiciones para inyección intraarticular.

45 La FIG. 4 muestra los resultados que confirman la velocidad de marcha (FIG. 4A) y la longitud de la zancada (FIG. 4B) de ratas mediante la inyección de las composiciones para inyección intraarticular (del Ejemplo 1-1, Ejemplo 2-1 y Ejemplo 2-7) de la presente invención después de la inducción de artritis.

La FIG. 5 muestra los resultados que confirman la extensión de la biosíntesis de proteoglicanos mediante la inyección de las composiciones para inyección intraarticular (del Ejemplo 1-1 y del Ejemplo 2-1) de la presente invención después de la inducción de artritis.

Mejor modo de llevar a cabo la invención

50 A continuación se describirán en detalle realizaciones preferibles de la presente invención. Sin embargo, la presente invención no se limita a las realizaciones descritas en el presente documento sino que puede realizarse de otras formas. Más bien, estas realizaciones se proporcionan para que esta divulgación sea minuciosa y completa, y transmita plenamente el alcance de la invención a los expertos en la técnica.

Ejemplo 1: Preparación de composiciones que contenían ácido nucleico y quitosano para inyección intraarticular

Se preparó una solución madre de ácido nucleico colocando un ácido nucleico en una solución tampón de fosfato sódico dibásico dodecahidrato 190 mM y disolviendo el ácido nucleico en ella durante 30 minutos o más usando un agitador térmico a 70 °C.

5 Se preparó una solución madre de quitosano usando ácido acético 100 mM.

Las soluciones madre de ácido nucleico y quitosano preparadas se mezclaron y luego se agitaron en un agitador térmico a 70 °C durante 30 minutos. Después, la temperatura se redujo a temperatura ambiente y se agitó durante 1 hora, preparándose así cada composición que contenía un ácido nucleico y quitosano para inyección intraarticular. En el presente documento, el mezclado se realizó de manera que las concentraciones de ácido nucleico y quitosano fueran las mismas que las que se muestran en la Tabla 1 a continuación.

Tabla 1

Constitución	Concentración final (% en peso)		Relación de mezclado (relación en peso)	
	Ácido nucleico	Quitosano	Ácido nucleico	Quitosano
Ejemplo 1-1	1,5	0,015	100	1
Ejemplo 1-2	0,1	0,001	100	1
Ejemplo 1-3	0,1	0,1	1	1
Ejemplo 1-4	3	0,001	3000	1
Ejemplo 1-5	3	0,1	30	1

Ejemplo 2: Preparación de composiciones que contenían ácido nucleico, quitosano y ácido hialurónico para inyección intraarticular

15 Se preparó una solución madre de ácido nucleico colocando un ácido nucleico en una solución tampón de fosfato sódico dibásico dodecahidrato 190 mM y disolviendo el ácido nucleico en ella durante 30 minutos o más usando un agitador térmico a 70 °C.

Se preparó una solución madre de quitosano usando ácido acético 100 mM.

20 Las soluciones madre de ácido nucleico y quitosano preparadas se mezclaron y luego se agitaron en un agitador térmico a 70 °C durante 30 minutos. Se mezcló adicionalmente la materia prima ácido hialurónico con la solución de mezcla de ácido nucleico y quitosano, y la mezcla resultante se agitó en un agitador térmico a 60 °C durante 1 hora, y luego se agitó a temperatura ambiente durante 3 horas, preparando de ese modo cada composición que contenía un ácido nucleico, quitosano y ácido hialurónico para inyección intraarticular. En el presente documento, el mezclado se realizó de manera que las concentraciones de ácido nucleico, quitosano y ácido hialurónico fueran las mismas que las que se muestran en la Tabla 2 a continuación.

Tabla 2

Constitución	Concentración final (% en peso)			Relación de mezclado (relación en peso)		
	Ácido nucleico	Quitosano	Ácido hialurónico	Ácido nucleico	Quitosano	Ácido hialurónico
Ejemplo 2-1	1,5	0,03	1,5	50	1	50
Ejemplo 2-2	0,1	0,001	0,1	100	1	100
Ejemplo 2-3	0,1	0,001	3	100	1	3000
Ejemplo 2-4	0,1	0,1	0,1	1	1	1
Ejemplo 2-5	0,1	0,1	3	1	1	30
Ejemplo 2-6	3	0,001	0,1	3000	1	100
Ejemplo 2-7	3	0,001	3	3000	1	3000

Ejemplo 2-8	3	0,1	0,1	30	1	1
Ejemplo 2-9	3	0,1	3	30	1	30

Como ácido hialurónico, se usó un ácido hialurónico que tenía un peso molecular de 1.000 kDa, pero se puede usar un ácido hialurónico que tenga un peso molecular de 20-10.000 kDa.

Ejemplo comparativo 1: Preparación de composiciones para inyección intraarticular como comparaciones

- 5 Las composiciones para inyección intraarticular como comparaciones se prepararon según las relaciones de mezclado correspondientes a los ingredientes y contenidos mostrados en la Tabla 3 a continuación. Se utilizaron los mismos métodos de preparación que en los Ejemplos 1 y 2.

Tabla 3

Constitución	Concentración final (% en peso)			Relación de mezclado (relación en peso)		
	Ácido nucleico	Quitano	Ácido hialurónico	Ácido nucleico	Quitano	Ácido hialurónico
Ejemplo comparativo 1-1	2	0	0	1	0	0
Ejemplo comparativo 1-2	0	1	0	0	1	0
Ejemplo comparativo 1-3	0	0	2	0	0	1
Ejemplo comparativo 1-4	1,5	0	1,5	1	0	1
Ejemplo comparativo 1-5	1,5	0,0001	0	15000	1	0
Ejemplo comparativo 1-6	1,5	1	0	1,5	1	0
Ejemplo comparativo 1-7	0,001	0,0001	0,001	10	1	10
Ejemplo comparativo 1-8	0,001	0,000001	0,001	1000	1	1000
Ejemplo comparativo 1-9	1,5	0,5	1,5	3	1	3
Ejemplo comparativo 1-10	1,5	0,00075	1,5	2000	1	2000
Ejemplo comparativo 1-11	6	0,03	1,5	200	1	50
Ejemplo comparativo 1-12	6	0,03	6	200	1	200
Ejemplo comparativo 1-13	0	0,03	1,5	0	1	50
Ejemplo comparativo 1-14	0	0,03	6	0	1	200

Ejemplo de ensayo 1: Verificación de las propiedades físicas de las composiciones para inyección intraarticular

Las composiciones para inyección intraarticular del Ejemplo 1 (Ejemplos 1-1 a 1-5), Ejemplo 2 (Ejemplos 2-1 a 2-9) y Ejemplo Comparativo 1 (Ejemplos Comparativos 1-1 a 1-14) se usaron para investigar la gelificación, la estabilidad del gel y la solubilidad del gel.

- 5 Cada composición se mezcló y luego se dejó durante 3 días. La transparencia y el estado de gelificación de la misma se observaron a simple vista. La gelificación se investigó mediante un cambio creciente en la viscoelasticidad usando un reómetro mientras la temperatura se elevó de 24 °C a 40 °C en etapas de 1°C y se mantuvieron durante 1 minuto. La estabilidad del gel se investigó mediante la formación de precipitados y la separación de capas. Para la solubilidad en gel, las composiciones para inyección intraarticular del Ejemplo 1, Ejemplo 2 y Ejemplo Comparativo 1 se gotearon en una solución acuosa a 37,5 °C, seguido de gelificación, y luego se investigó la disolución del gel mientras se realizaba agitación a 400 rpm durante 5 minutos manteniendo la temperatura a 37,5°C. Los resultados se muestran en la Tabla 4 y la FIG. 1.
- 10

Tabla 4

Constitución	Resultados después de 3 días			Resultados de agitación a 37,5 °C durante 5 minutos
	Viscoelasticidad	Formación de precipitados	Separación de capas	Disolución del gel
Ejemplo 1-1	○	×	×	×
Ejemplo 1-2	○	×	×	×
Ejemplo 1-3	○	×	×	×
Ejemplo 1-4	○	×	×	×
Ejemplo 1-5	○	×	×	×
Ejemplo 2-1	○	×	×	×
Ejemplo 2-2	○	×	×	×
Ejemplo 2-3	○	×	×	×
Ejemplo 2-4	○	×	×	×
Ejemplo 2-5	○	×	×	×
Ejemplo 2-6	○	×	×	×
Ejemplo 2-7	○	×	×	×
Ejemplo 2-8	○	×	×	×
Ejemplo 2-9	○	×	×	×
Ejemplo comparativo 1-1	○	×	×	○
Ejemplo comparativo 1-2	×	×	×	○
Ejemplo comparativo 1-3	○	○	○	○
Ejemplo comparativo 1-4	○	×	×	○
Ejemplo comparativo 1-5	○	×	×	○
Ejemplo comparativo 1-6	×	○	×	○

Ejemplo comparativo 1-7	x	x	x	o
Ejemplo comparativo 1-8	x	x	x	o
Ejemplo comparativo 1-9	o	o	x	o
Ejemplo comparativo 1-10	o	x	x	o
Ejemplo comparativo 1-11	x	o	x	x
Ejemplo comparativo 1-12	x	o	x	x
Ejemplo comparativo 1-13	o	o	o	o
Ejemplo comparativo 1-14	o	o	o	o

Con referencia a la Tabla 1 y la FIG. 1, en cuanto a las composiciones para inyección intraarticular del Ejemplo 1 y del Ejemplo 2, se puede observar que la formación de precipitados y la separación de capas no se produjeron mientras se mantenía la viscoelasticidad, incluso después de tres días, y en términos de solubilidad del gel, los geles se formaron a 37,5 °C y los geles formados se mantuvieron continuamente.

Sin embargo, en cuanto a las composiciones para inyección intraarticular como comparaciones del Ejemplo Comparativo 1, se confirmó que se produjo formación de precipitados o separación de capas o se formaron grumos parcialmente, lo que hizo imposible medir la viscoelasticidad y, en términos de solubilidad del gel, no se produjeron geles a 37,5 °C e incluso cuando hubo gelificación los geles se disolvieron completamente en 5 minutos o menos. Especialmente en las composiciones que no contenían ácido nucleico como en los Ejemplos Comparativos 1-13 y 1-14 se confirmó que las composiciones tenían viscoelasticidad pero en ellas se produjo formación de precipitados y separación de capas, y se formaron geles a 37,5 °C y luego se disolvieron completamente en 5 minutos o menos, lo que indicó una estabilidad deficiente (véase la Tabla 4).

A través de estos resultados, se puede ver que la composición para inyección intraarticular de la presente invención muestra termosensibilidad dependiente del cambio de temperatura y mantiene continuamente una forma de gel incluso después de la gelificación. Por lo tanto, se puede predecir que la composición inyectada de la presente invención está gelificada para restaurar la viscosidad y la elasticidad en las cavidades articulares, permitiendo acciones lubricantes y de absorción de impactos continuas, protegiendo así la articulación y promoviendo un efecto restaurador de los tejidos del cartílago dañados a través de una mayor retención del fármaco, lo que produce excelentes efectos terapéuticos para la artritis.

Ejemplo de ensayo 2: Verificación de la transición sol-gel dependiente de la temperatura

Se verificó que se formaron hidrogeles que tenían una transición sol-gel dependiente de la temperatura en las composiciones para inyección intraarticular del Ejemplo 1, Ejemplo 2 y Ejemplo Comparativo 1.

Se utilizó un reómetro para investigar la transición sol-gel. Las condiciones de medición utilizadas en el presente documento fueron PU20, espacio de 0,5 mm, 0,1 Hz y tensión-deformación 1%. Los cambios de G' (elasticidad) y G'' (viscosidad) se midieron mientras la temperatura se elevó de 24°C a 40°C en etapas de 1°C y se mantuvieron durante 1 minuto. Además, la transición sol-gel después y antes de 36 °C se observó a simple vista mientras se elevaba la temperatura de cada composición y los resultados se muestran en la Figura 2.

Como se muestra en la FIG. 2, se observó que la composición para inyección intraarticular del Ejemplo 1-1 mostró una forma de sol a una temperatura inferior a 36 °C mientras que estaba gelificada a una temperatura superior a 36 °C. Se confirmó que estos resultados eran los mismos en todas las composiciones para inyección intraarticular del Ejemplo 1 y del Ejemplo 2.

Por lo tanto, se puede observar que las composiciones para inyección intraarticular de la presente invención exhiben una propiedad como hidrogel termosensible de la cual se produce una transición sol-gel dependiente de la temperatura.

Ejemplo de ensayo 3: Preparación de animales de experimentación

Para el experimento con animales, se adquirieron ratas macho Sprague-Dawley de 7 semanas de edad de Young Bio (Seongnam, Corea). Como alimento se utilizó un alimento sólido para animales de experimentación (Harlan Laboratories, Inc., EE. UU.). El alimento sólido se colocó en un comedero y estuvo disponible libremente. Para el agua potable, el agua del grifo se filtró a través de un filtro esterilizador, se irradió con luz ultravioleta y luego estuvo disponible libremente a través de un dispositivo automático de suministro de agua. El ambiente de una sala de cría de animales experimentales se mantuvo a una temperatura de 23 ± 3 °C, una humedad relativa del $55 \pm 15\%$, un tiempo de iluminación de 12 horas (de 8:00 am a 8:00 pm) y una iluminación de 150-300 Lux.

Ejemplo de ensayo 4: Verificación de la biocompatibilidad de composiciones para inyección intraarticular

Las ratas en el Ejemplo de Ensayo 3 fueron anestesiadas respirando isoflurano. Se afeitaron los pelos de la rodilla derecha de las ratas anestesiadas, y se desinfectó un lugar de inyección con algodón impregnado con betadine, y después se inyectaron 0,05 cc de las composiciones para inyección intraarticular del Ejemplo 1-1 y del Ejemplo 1-2 en la rodilla derecha usando una jeringa de insulina esterilizada de 1 cc y una aguja de calibre 30. Además, se inyectó solución salina como grupo control mediante el mismo método.

Después de la inyección de la composición para inyección intraarticular, las ratas fueron sacrificadas con CO₂ gas, y luego se cortó el tejido de la rodilla derecha, se fijó con formalina y se incrustó en parafina a través de una serie de procesos de deshidratación, fabricando así un bloque de parafina. En este caso también se utilizó tejido de la rodilla izquierda de ratas no tratadas como grupo normal para fabricar un bloque de parafina. Cada uno de los bloques de parafina se cortó en una sección de tejido con un espesor de 5 µm, y la sección de tejido se hizo reaccionar con solución de hematoxilina de Mayer (Sigma, EE. UU.) durante 1 segundo y luego se lavó con un flujo de agua durante 10 minutos. Posteriormente, la sección de tejido se hizo reaccionar con una solución de eosina (Sigma, EE. UU.) durante 3 segundos. La sección de tejido completada con tinción se deshidrató y luego se selló con Permount® (Fischer Scientific, EE.UU.). La biocompatibilidad de la composición se investigó observando la presencia o ausencia de cambios histopatológicos usando un microscopio en la sección de tejido teñida con H&E. Los resultados se muestran en la FIG. 3.

Con referencia a las secciones de tejido teñidas con H&E que se muestran en la FIG. 3, no se observó una respuesta inflamatoria en la inyección de las composiciones para inyección intraarticular del Ejemplo 1-1 y del Ejemplo 2-1 como en el grupo control al que se inyectó solución salina y el grupo normal no tratado.

Por lo tanto, se verificó que las composiciones para inyección intraarticular de la presente invención son composiciones biocompatibles que no causan respuesta inmune ni respuesta inflamatoria.

Ejemplo de ensayo 5: Verificación del efecto analgésico de composiciones para inyección intraarticular

Las ratas en el Ejemplo de Ensayo 3 se anestesiaron respirando isoflurano. Se afeitaron los pelos de la rodilla derecha de las ratas anestesiadas y se desinfectó un lugar de inyección con algodón impregnado con betadine, y luego se inyectó una vez en la rodilla 1 mg/50 µL de yodoacetato monosódico (MIA) diluido en cloruro de sodio (NaCl) al 0,9% mediante inyección intraarticular usando una jeringa de insulina esterilizada de 1 cc y una aguja de calibre 30, y luego las ratas fueron criadas durante 1 semana, causando así artritis.

Las ratas con artritis inducidas se anestesiaron respirando isoflurano. Se afeitaron los pelos de la rodilla derecha de las ratas anestesiadas, y se desinfectó un lugar de inyección con algodón impregnado con betadine, y después se inyectaron las composiciones para inyección intraarticular del Ejemplo 1, Ejemplo 2 y Ejemplo Comparativo 1 una vez a la semana durante un total de cuatro veces utilizando una jeringa de insulina esterilizada de 1 cc y una aguja de calibre 30. Se inyectaron 0,05 cc de la composición cada vez. En este caso, se inyectó solución salina en la rodilla derecha como grupo de control y se utilizaron ratas sin inducción de artritis como grupo normal.

El efecto analgésico se investigó inyectando la composición para inyección intraarticular en las ratas cuatro veces, fotografiando la superficie inferior de una jaula de plástico (150 cm x 13 cm x 16 cm) a través de una cámara de vídeo cuando la rata atravesaba la jaula de plástico para observar el movimiento de la rata, y analizando luego la velocidad de marcha y la longitud de la zancada de la rata utilizando las imágenes fotografiadas a través de un programa que reconoce las plantas de los pies de la rata. Los resultados se muestran en la FIG. 4.

Como se muestra en los resultados que confirman la velocidad de marcha (FIG. 4A) y la longitud de la zancada (FIG. 4B) de las ratas en la FIG. 4, la velocidad de marcha y la longitud de zancada de las ratas se redujeron en el grupo de control inyectado con solución salina en comparación con el grupo normal, mientras que la velocidad de marcha y la longitud de la zancada reducidas debido a la artritis se restauraron para ser similares a las del grupo normal cuando se inyectaron las composiciones para inyección intraarticular del Ejemplo 1-1, el Ejemplo 2-1 y el Ejemplo 2-7. Se confirmaron resultados similares en todas las composiciones para inyección intraarticular del Ejemplo 1 y Ejemplo 2. Sin embargo, la velocidad de marcha y la longitud de la zancada de las ratas en las composiciones del Ejemplo Comparativo 1-3, Ejemplo comparativo 1-4 y Ejemplo comparativo 1-12, mostradas en la FIG. 4 fueron similares a los del grupo control al que se inyectó solución salina.

Se cree que la razón es que la artritis se trató mediante las composiciones para inyección intraarticular de la presente invención inyectadas en las cavidades articulares, de modo que se alivió el dolor causado por la artritis y, por tanto, se incrementó la velocidad de marcha y la longitud de la zancada de las ratas. Además, se prevé que la composición para inyección intraarticular de la presente invención tenga termosensibilidad y viscoelasticidad debido a la gelificación por la temperatura corporal, reduciendo así la fricción entre un hueso superior y un hueso inferior en la articulación y absorbiendo los golpes, lo que aumenta el efecto analgésico.

Ejemplo de ensayo 6: Verificación del efecto de regeneración del cartílago de la composición para inyección intraarticular

Ejemplo de ensayo 6-1: Establecimiento de modelos animales de artritis e inyección de composiciones

Las ratas en el Ejemplo de Ensayo 3 fueron anestesiadas respirando isoflurano. Se afeitaron los pelos de la rodilla derecha de las ratas anestesiadas y se desinfectó un lugar de inyección con algodón impregnado con betadine, y luego se inyectó una vez en la rodilla 1 mg/50 μ L de yodoacetato monosódico (MIA) diluido en cloruro de sodio (NaCl) al 0,9% mediante inyección intraarticular usando una jeringa de insulina esterilizada de 1 cc y una aguja de calibre 30, y luego las ratas fueron criadas durante 1 semana, causando así artritis. La inducción exitosa de la artritis fue confirmada por la reducción de la velocidad de marcha y la longitud de la zancada de las ratas.

En la rodilla derecha de las ratas con artritis inducida se inyectaron las composiciones para inyección intraarticular del Ejemplo 1, Ejemplo 2 y Ejemplo Comparativo 1 y solución salina como grupo de control, y luego las ratas se colocaron en una jaula y luego se criaron en un ambiente estable. En este caso, las composiciones para inyección intraarticular y solución salina se inyectaron a razón de 0,05 cc una vez por semana hasta un total de cuatro veces.

Ejemplo de ensayo 6-2: Verificación del efecto de regeneración del cartílago de la composición para inyección intraarticular

Después de inyectar cuatro veces la composición para inyección intraarticular de la presente invención como se muestra en el Ejemplo de ensayo 6-1, las ratas se sacrificaron mediante CO₂ gas, y luego se cortaron ambos tejidos de cartílago de la rodilla izquierda no tratada (grupo normal) y se inyectaron en las rodillas derechas las composiciones respectivas de los ejemplos y los ejemplos comparativos, seguido de la investigación del efecto de regeneración del cartílago.

El efecto de regeneración del cartílago se investigó mediante tinción con proteoglicanos. Los proteoglicanos son sustancias implicadas en la proliferación de condroblastos, y la proliferación de condroblastos es uno de los procedimientos esenciales para la generación del cartílago.

El tejido del cartílago de la rodilla se fijó con formalina y se incrustó en parafina mediante una serie de procesos de deshidratación, fabricando así un bloque de parafina. El bloque de parafina fabricado se cortó en una sección de tejido con 5 μ m de espesor y los proteoglicanos se tiñeron mediante tinción con safranina O para comparar la cantidad de proteoglicanos. En este caso, el tejido de la rodilla izquierda de las ratas sin inducción de artritis se usó como grupo normal, y el tejido de la rodilla de las ratas sometidas a inducción de artritis y luego a tratamiento con solución salina se usó como grupo de control. La cantidad de proteoglicanos se calculó como una relación relativa del área de tinción basada en la cantidad de proteoglicanos en el grupo normal como 100%. Los resultados se muestran en la FIG. 5 y Tabla 5.

Tabla 5

Constitución	Proteoglicano (%)
Grupo normal	100
Grupo control	42
Ejemplo 1-1	83
Ejemplo 1-3	81
Ejemplo 1-4	84
Ejemplo 2-1	88
Ejemplo comparativo 1-1	59
Ejemplo comparativo 1-2	47

Ejemplo comparativo 1-5	60
Ejemplo comparativo 1-10	62

Como se muestra en la FIG. 5, con respecto a los proteoglicanos en la superficie del cartílago teñido de rojo con safranina O (indicado por flechas), se puede ver que el área de la mancha roja en la superficie del cartílago se redujo en el grupo control en comparación con el grupo normal, lo que indica que la cantidad de proteoglicanos se redujo mediante la inducción de la artritis. Mientras que en la inyección de las composiciones para inyección intraarticular del Ejemplo 1-1 y del Ejemplo 2-1 se verificó que aumentaba la cantidad de proteoglicanos en la superficie del cartílago y, por tanto, aumentaba el área de la mancha roja en comparación con el grupo control.

Según los resultados del cálculo de la relación relativa del área de tinción de proteoglicanos en la Tabla 5, el grupo control mostró un valor numérico de 42% en comparación con el grupo normal, mientras que las inyecciones de las composiciones para inyección intraarticular del Ejemplo 1-1, Ejemplo 1-3, Ejemplo 1-4 y Ejemplo 2-1 mostraron un valor numérico de 80% o más. Sin embargo, se puede observar que las inyecciones de las composiciones para inyección intraarticular del Ejemplo Comparativo 1-1, Ejemplo Comparativo 1-2, Ejemplo Comparativo 1-5 y Ejemplo Comparativo 1-10 mostraron valores numéricos más bajos en comparación con la inyección de las composiciones para inyección intraarticular del Ejemplo 1 y el Ejemplo 2. Por lo tanto, se puede observar que en el cartílago de la cavidad de la articulación con inducción de artritis mediante la inyección intraarticular de las composiciones para intra-inyección del Ejemplo 1 y el Ejemplo 2, la expresión de proteoglicanos aumentó y, por tanto, se produjo la regeneración y restauración del cartílago.

REIVINDICACIONES

1. Una composición para inyección intraarticular, composición que contiene un ácido nucleico y quitosano,
En donde el contenido del ácido nucleico es 0,1-3% en peso con respecto al peso total de la composición,
En donde el contenido de quitosano es 0,001-0,1% en peso con respecto al peso total de la composición y
5 En donde la relación en peso del ácido nucleico y el quitosano es 1:1 a 3000:1.
2. La composición según la reivindicación 1, en donde el ácido nucleico es ácido desoxirribonucleico (ADN), ácido ribonucleico (ARN), o una mezcla de los mismos.
3. La composición según la reivindicación 2, en donde el ácido nucleico es ácido desoxirribonucleico (ADN).
4. La composición según la reivindicación 3, en donde el ácido desoxirribonucleico se selecciona entre
10 oligonucleótidos, polinucleótidos y polidesoxirribonucleótidos.
5. La composición según la reivindicación 1, en donde el ácido nucleico tiene un peso molecular de 1-100.000 kDa.
6. La composición según la reivindicación 5, en donde el ácido nucleico tiene un peso molecular de 10-10.000 kDa.
7. La composición según la reivindicación 6, en donde el ácido nucleico tiene un peso molecular de 50-3.500 kDa.
8. La composición según la reivindicación 1, en donde el quitosano tiene un peso molecular de 3-1.000 kDa.
9. La composición según la reivindicación 1, en donde la composición contiene un polímero soluble en agua como
15 ingrediente adicional.
10. La composición según la reivindicación 9, en donde el polímero soluble en agua es al menos uno seleccionado del grupo que consiste en ácido hialurónico, sulfato de condroitina, glucógeno, dextrina, dextrano, sulfato de dextrano, hidroxipropilmetilcelulosa, ácido algínico, quitina, pululano, colágeno, gelatina, hidrolizados de todos los anteriores,
20 poli(alcohol vinílico), polivinilpirrolidona, poli(ácido acrílico) y polímeros carboxivinílicos.
11. La composición según la reivindicación 10, en donde el polímero soluble en agua es ácido hialurónico.
12. La composición según la reivindicación 1, en donde la composición es un hidrogel, en el cual se produce una transición sol-gel dependiente de la temperatura.
13. La composición según la reivindicación 1 para uso en el tratamiento de enfermedades articulares mediante
25 inyección intraarticular, en donde la inyección intraarticular es una administración para al menos un síntoma seleccionado del grupo que consiste en hernia de núcleo pulposo, hombro congelado, síndrome de pinzamiento, síndrome del túnel carpiano, artritis degenerativa, codo de tenista/golfista, síndrome de dolor regional complejo, otros síntomas de tendinitis y reumatismo articular crónico.

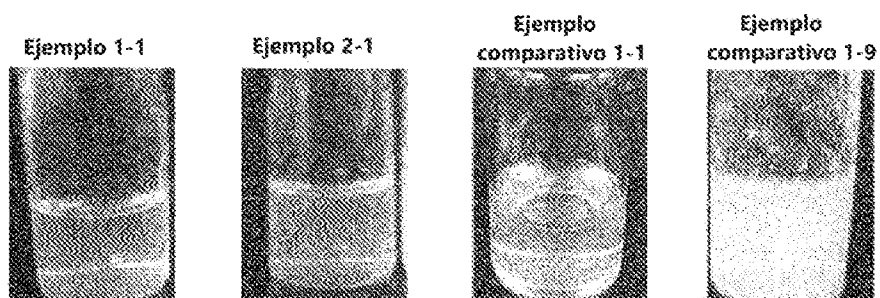


FIG. 1

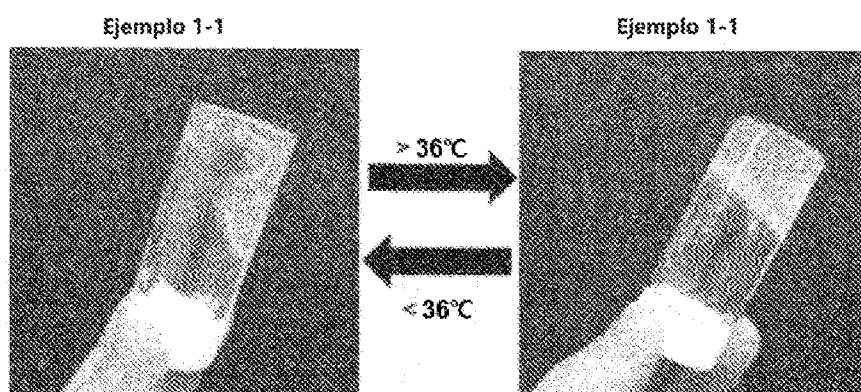


FIG. 2

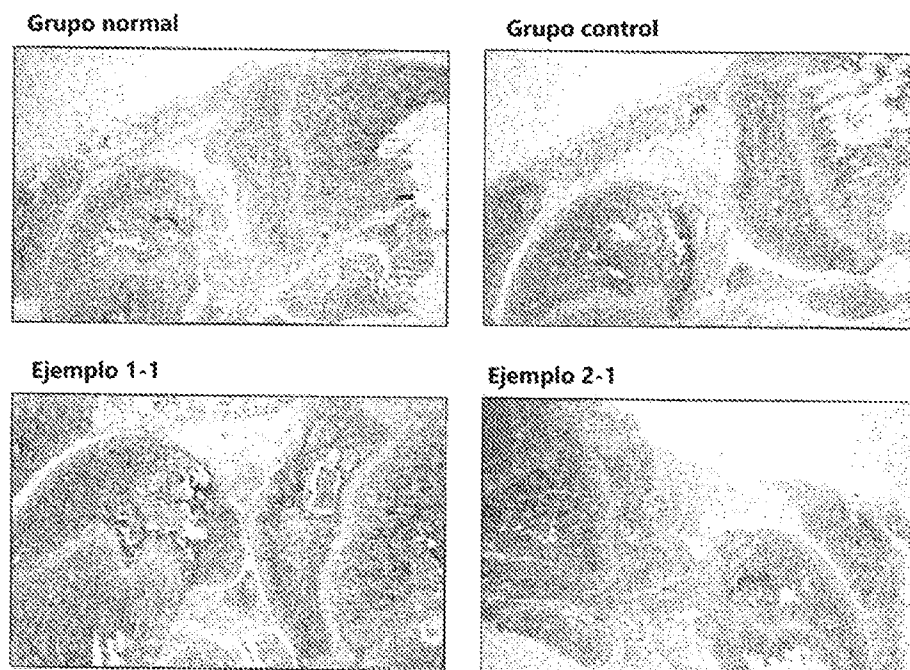


FIG. 3

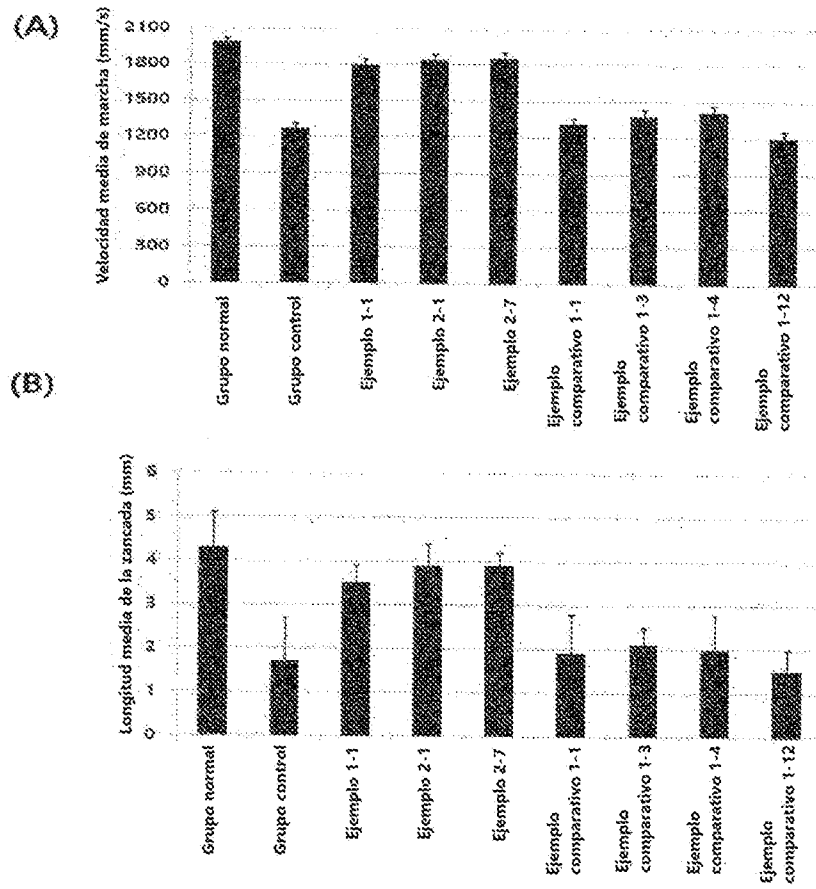


FIG. 4

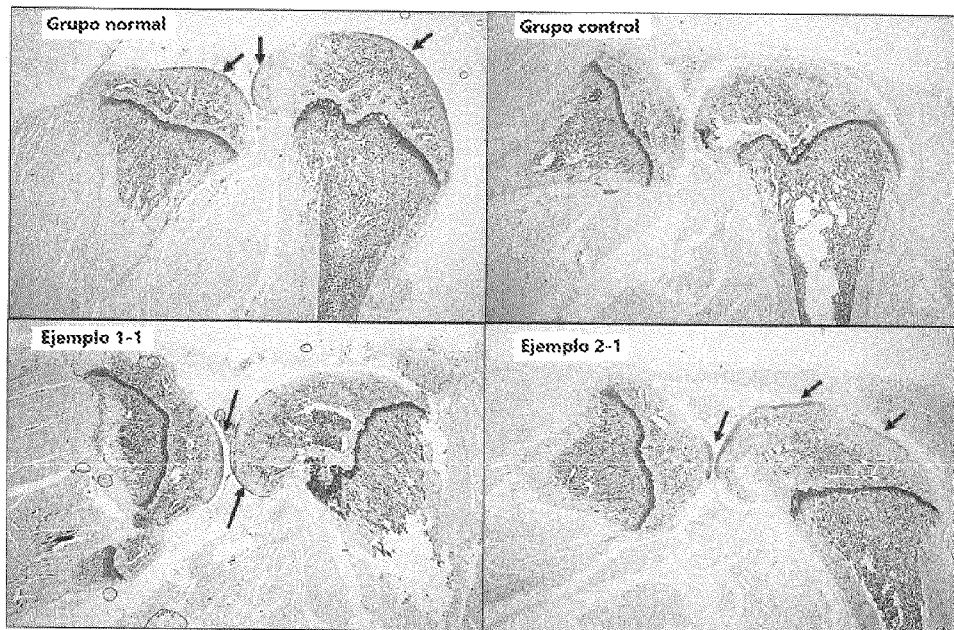


FIG. 5