

(12) **FASCÍCULO DE PATENTE DE INVENÇÃO**

(22) Data de pedido: <b>2005.12.20</b>	(73) Titular(es): <b>GENZYME CORPORATION</b> <b>500 KENDALL STREET CAMBRIDGE, MA 02142</b> <b>US</b>
(30) Prioridade(s): <b>2004.12.30 US 640749 P</b>	
(43) Data de publicação do pedido: <b>2007.09.26</b>	(72) Inventor(es): <b>FRANCOIS BAILLEUL</b> <b>FR</b>
(45) Data e BPI da concessão: <b>2013.10.09</b> <b>210/2013</b>	(74) Mandatário: <b>JOSÉ RAUL DE MAGALHÃES SIMÕES</b> <b>RUA CASTILHO, 167 - 2.º 1070-050 LISBOA</b> <b>PT</b>

(54) Epígrafe: **REGIMES PARA VISCOSSUPLEMENTAÇÃO INTRA-ARTICULAR**

(57) Resumo:

A PRESENTE INVENÇÃO REFERE-SE A MÉTODOS DE VISCOSSUPLEMENTAÇÃO PARA O TRATAMENTO DE OSTEOARTRITE E LESÃO DE ARTICULAÇÕES COM VISCOSSUPLEMENTOS À BASE DE HA, PARTICULARMENTE VISCOSSUPLEMENTOS COM UMA SEMIVIDA DE RESIDÊNCIA INTRA-ARTICULAR DE MENOS DE 3 SEMANAS. OS VISCOSSUPLEMENTOS PARA UTILIZAÇÃO NOS MÉTODOS DA INVENÇÃO PODEM SER ADICIONALMENTE CARACTERIZADOS POR CONTEREM MENOS DE 20 MG/ML DE HA, PELO MENOS 5% (P/P) DOS QUAIS ESTÃO EM FORMA DE GEL COMO, POR EXEMPLO, HILANO B. NUMA FORMA DE REALIZAÇÃO ILUSTRATIVA, HILANO G-F 20 (SYNVISCO®) É ADMINISTRADO NUMA ÚNICA INJEÇÃO INTRA-ARTICULAR DE  $6 \pm 2$  ML NO JOELHO.

**RESUMO****REGIMES PARA VISCOSSUPLEMENTAÇÃO INTRA-ARTICULAR**

A presente invenção refere-se a métodos de viscoossuplementação para o tratamento de osteoartrite e lesão de articulações com viscoossuplementos à base de HA, particularmente viscoossuplementos com uma semivida de residência intra-articular de menos de 3 semanas. Os viscoossuplementos para utilização nos métodos da invenção podem ser adicionalmente caracterizados por conterem menos de 20 mg/ml de HA, pelo menos 5% (p/p) dos quais estão em forma de gel como, por exemplo, hilano B. Numa forma de realização ilustrativa, hilano G-F 20 (Synvisc®) é administrado numa única injeção intra-articular de  $6 \pm 2$  ml no joelho.

## DESCRIÇÃO

### REGIMES PARA VISCOSSUPLEMENTAÇÃO INTRA-ARTICULAR

#### Campo da Invenção

A presente invenção refere-se a reumatologia e ortopedia. Mais especificamente, a invenção refere-se ao tratamento de patologias da cartilagem (por exemplo, osteoartrite) por viscosuplementação.

#### Antecedentes da Invenção

A osteoartrite (OA) é um distúrbio degenerativo progressivo caracterizado por uma degradação da cartilagem nas articulações, uma deterioração do fluido sinovial presente nas juntas articulares e uma osteoesclerose subcondral acompanhada por formação de osteófito. Pacientes com OA frequentemente exibem fortes dores que afectam muitos aspectos de sua vida diária. A prevalência de OA aumenta com a idade, com mais de 60% daqueles com 60 anos de idade ou mais provavelmente com alguma anormalidade de cartilagem (Bjelle (1982) Scand. J. Rheumatol. Supl., 43: 35-48). A OA se tornou a forma mais onerosa de artrite, colectivamente representando até 1 - 2,5% do produto nacional bruto das nações ocidentais (Reginster (2002) Rheumatology, 41 (Supl. 1): 3-6).

O fluido sinovial lubrifica e protege as superfícies da articulação intra-articular. O fluido é composto principalmente pelo polissacárido de elevado peso molecular hialuronano (HA, sal sódico de ácido hialurónico, também conhecido como hialuronato de sódio). A concentração de HA no fluido articular sinovial humano normal é de aproximadamente 3 mg/ml. O HA consiste em unidades

dissacarídicas repetidas de N-acetilglucosamina e glicuronato de sódio (Figura 1). O HA no fluido sinovial normal das articulações contém 12,500 unidades dissacarídicas, com um peso molecular (PM) total de 5 MDa (Balazs et al. (1993) J. Rheumatol. Supl., 39: 3-9). Em pacientes com OA, a concentração e o PM do HA no fluido sinovial diminui, resultando numa capacidade diminuída do fluido de proteger a cartilagem.

Demonstrou-se que a injeção intra-articular de uma solução elastoviscosa contendo HA de elevado peso molecular restaura a homeostasia normal da articulação doente. Esse procedimento, conhecido como viscosuplementação, se mostrou eficaz na redução da dor e no aumento da função articular (veja-se, por exemplo, Balazs et al. (1993) J. Rheumatol. Supl., 39: 3-9; Wobig (1998) Clin. Ther., 20(3): 410-423).

Inúmeros viscosuplementos à base de HA estão disponíveis no mercado, e novos produtos estão a ser desenvolvidos. Viscosuplementos variam em inúmeras características, incluindo, por exemplo, a fonte de HA (derivado de animal ou bacteriano), a concentração e PM do HA e o tipo e grau de reticulação química usada, caso haja. Normalmente, a maioria dos viscosuplementos contém 5-15 mg/ml de HA e, uma vez injectados, têm uma semivida de residência entre horas a vários dias. Esses viscosuplementos são injectados no joelho em volumes unitários de 2 - 3 ml numa série de três a cinco injeções cada a uma semana de distância. Em alguns casos, o alívio da dor ocorre em poucos dias, continua a progredir durante algumas semanas e frequentemente dura vários meses, mesmo até um ano. Por exemplo, a viscosuplementação do joelho com Synvisc® (hilano G-F 20; Genzyme Corp., Cambridge, MA) administrada três vezes a 2 ml por semana demonstrou ser

pelo menos tão boa, ou melhor, que a terapia oral contínua com fármacos anti-inflamatórios não esteróides (AINEs) mais artrocentese durante um período de 6 meses (Adams *et al.* (1995) *Osteoarthritis and Cartilage*, 3:213-225) e mais eficaz que um placebo salino ou controles de artrocentese (Moreland (1993) *Am. Coll. Rheumatol.* (57th Ann. Sci. Meeting, Nov. 7-11, San Antonio, TX), 165; Wobig (1998) *Clin. Ther.*, 20(3): 410-423).

Considerava-se que a série de múltiplas injeções era essencial para um efeito prolongado (seis meses a um ano) sobre a dor osteoartrítica, principalmente por causa da curta semivida de residência da maioria dos viscosuplementos (Peyron (1993) *J. Rheumatol.*, 20 (Supl. 39): 10-15). Por exemplo, a semivida de residência intra-articular de 1% de HA com um PM médio de 1,7 - 2,6 MDa é de 11 horas, conforme determinada em coelhos. Quando o PM do HA aumenta, a semivida de residência também o faz (por exemplo, 1% de hilano A, em que o PM médio do HA é de 6 MDa, tem uma semivida de 1,2 ± 1 dias). Entretanto, mesmo um gel insolúvel, como hilano B contendo 0,4% de HA, tem uma semivida de residência relativamente curta de 7,7 ± 1 dias. Consistente com os dados de semivida, demonstrou-se que três injeções de 2 ml de Synvisc® num joelho com OA são significativamente mais eficazes para reduzir a dor de OA do que duas injeções de 2 ml (Scale *et al.* (1994) *Curr. Ther. Res.*, 55(3): 220-232).

Para o tratamento com Synvisc® de pacientes com OA do quadril, a dose recomendada é uma injeção de 2 ml com uma segunda injeção opcional administrada entre um e três meses, se um alívio de dor insuficiente for experimentado (Chevalier (2000) *Am. Coll. Rheumatol.* (64th Annual Scientific Meeting, 30 de Out. - 3 de Nov., Philadelphia, PA)). Em pacientes com OA do quadril, uma única injeção

intra-articular de Synvisc® a 2 ml mostrou um efeito sintomático imediato e mantido significativo na maioria dos pacientes arrolados durante até três meses (duração do estudo). Não foi investigado se volumes maiores de viscosuplementos, como Synvisc® (por exemplo, 4, 6 ml ou mais), poderiam oferecer uma eficácia equivalente ou melhor com menos injeções, em comparação com múltiplas injeções de 2 - 3 ml ou uma única injeção de 2 ml. Do que se sabe, a utilização de maiores volumes apresenta o risco em potencial de efeitos secundários locais, como dor, inchaço e efusão.

Durolane™ (Q-Med AB, Uppsala, Suécia) é o único viscosuplemento que é recomendado para ser injectado uma vez a 3 ml. É um viscosuplemento reticulado de epoxi com uma semivida relatada mais longa (4 semanas) e uma concentração mais elevada de HA (20 mg/ml). Acredita-se que o tempo de residência prolongado permita o número reduzido de injeções. Todavia, uma única injeção de Durolane™ não demonstrou benefícios estatísticos com relação ao placebo (Altman et al. (2004) Osteoarthritis and Cart., 12: 642-649).

Assim, antes da presente invenção, não se sabia se uma única injeção de um viscosuplemento à base de HA, particularmente um com um curto tempo de residência, poderia produzir um efeito terapêutico a longo prazo desejado.

A utilização de menos injeções oferece vantagens aparentes com relação às múltiplas injeções, incluindo evitar efeitos secundários, custos reduzidos e melhor aceitação pelo paciente. Existe uma necessidade contínua de desenvolver novos tratamentos de viscosuplementação que proporcionem um alívio eficaz a pacientes com OA, sem

necessidade de múltiplas injeções.

### **SUMÁRIO DA INVENÇÃO**

A invenção proporciona um viscossuplemento para utilização no tratamento de dor da articulação do joelho num indivíduo humano, por exemplo, associada a osteoartrite e lesão de articulações.

Consequentemente, a invenção proporciona um viscossuplemento que compreende hialuronano reticulado (HA) para utilização no tratamento de dor da articulação do joelho num indivíduo humano por meio de um regime de tratamento, em que o viscossuplemento tem uma semivida de residência na articulação de menos de 3 semanas, e em que o regime de tratamento compreende uma única administração intra-articular do viscossuplemento numa quantidade suficiente para proporcionar um efeito terapêutico por até seis meses à articulação do joelho

A invenção também proporciona a utilização de um viscossuplemento que compreende hialuronano reticulado (HA) no fabrico de um medicamento para tratar a dor da articulação do joelho num indivíduo humano por meio de um regime de tratamento, em que o viscossuplemento tem uma semivida de residência na articulação de menos de 3 semanas, e em que o regime de tratamento compreende uma única administração intra-articular do viscossuplemento numa quantidade suficiente para proporcionar um efeito terapêutico por até seis meses à articulação do joelho.

A invenção baseia-se, pelo menos em parte, na descoberta de que uma única injeção intra-articular de maior volume de um viscossuplemento proporciona benefícios terapêuticos a longo prazo, comparáveis aos produzidos por

injecções seriadas de volumes menores. Num estudo conduzido com relação à invenção, um grupo de pacientes com OA do joelho recebeu a sequência padrão de três injecções de 2 ml de Synvisc® no joelho durante um período de três semanas, ao passo que outro grupo recebeu uma única injecção de 6 ml sob condições idênticas. Surpreendentemente, a eficácia terapêutica, conforme avaliada 26 semanas após o tratamento, se mostrou comparável em ambos os grupos. Assim, uma única injecção de um maior volume de um viscosuplemento, como Synvisc®, pode ser tão eficaz quanto várias injecções de volumes menores, mantendo, ao mesmo tempo, um perfil de segurança favorável.

Portanto, a invenção apresenta regimes para viscosuplementação intra-articular com viscosuplementos à base de HA com uma semivida de residência intra-articular ( $T_{1/2}$ ) menor que 3 semanas. Viscosuplementos para utilização na invenção podem ser caracterizados ainda por conter menos de 20 mg/ml de HA (derivatizado por reticulação), dos quais pelo menos 5% estão numa forma de gel como, por exemplo, hilano B. Numa forma de realização ilustrativa, o viscosuplemento é hilano G-F 20 (Synvisc®), que contém  $8 \pm 2$  mg/ml de HA, dos quais 10% em peso estão numa forma de gel.

O viscosuplemento é para administrado numa única injecção, numa quantidade suficiente para proporcionar um efeito terapêutico durante até 6 meses após a injecção. Em algumas formas de realização, o efeito terapêutico de uma única injecção de um volume maior é substancialmente o mesmo que o conseguido por três injecções (cada uma de 1/3 do volume maior) administradas no decorrer do tratamento. Numa forma de realização ilustrativa, Synvisc® é administrado numa única injecção de 6 ml, em vez de três injecções de 2 ml, durante um período de três semanas.



## **BREVE DESCRIÇÃO DAS FIGURAS**

A Figura 1 ilustra a estrutura do hialuronano (hialuronato de sódio).

## **DESCRIÇÃO DETALHADA DA INVENÇÃO**

### Definições

Os termos "semivida intra-articular", "semivida de residência" e seus cognatos referem-se ao tempo que é o maior de qualquer um dos tempos aplicáveis a um dado viscosuplemento injectado no espaço intra-articular: (a) o tempo requerido para uma depuração de 50% do componente de gel de HA injectado; (b) o tempo requerido para uma depuração de 50% do componente fluido de HA injectado; e (c) o tempo requerido para a depuração de 50% do HA, independentemente de se está em forma fluida, de gel ou outra. Para fins do cálculo da semivida de residência, a menos que declarado de outra forma, a injeção é considerada como sendo administrada no espaço intra-articular de uma articulação de joelho de um ser humano adulto. Métodos para determinar a semivida e residência são conhecidos na técnica, e métodos ilustrativos são descritos nos exemplos.

Os termos "fluido de HA", "fase fluida de HA", "componente fluido de HA", "HA solúvel" e seus cognatos referem-se a HA solúvel em água levemente reticulado, com um PM médio de menos de 20 MDa.

Os termos "gel de HA", "fase de gel de HA", "componente de gel de HA" e seus cognatos referem-se a um gel de HA que seja uma parte insolúvel em água de uma composição à base de HA que não contenha HA solúvel ou

contenha menos de 10% (p/p) de HA solúvel. Tipicamente, a quantidade de gel numa dada composição à base de HA contendo uma mistura de gel de HA e fluido de HA pode ser determinada separando-se o gel de HA do fluido de HA. A separação pode ser realizada por filtração da composição através, por exemplo, de um filtro de 45  $\mu$ m, que deixe passar HA solúvel, mas retenha a fase insolúvel. Para maximizar a liberação de HA solúvel do gel de HA em composições mais viscosas, uma composição pode precisar ser diluída com vários volumes de um solvente, ou sem levá-la ao equilíbrio antes da filtração. Além disso, geralmente, géis puros podem ser distinguidos de fluidos puros com base em suas propriedades reológicas, como módulo de armazenamento (elástico) ( $G'$ ) e módulo de perda (viscoso) ( $G''$ ), que representam, respectivamente, os graus relativos que um material pode se recuperar (resposta elástica) ou fluir (resposta viscosa) quando a taxa de deformação (frequência do teste) se altera. Ambos os módulos são funções lineares da frequência. Eles se mostraram sondas sensíveis da estrutura de soluções e géis de polímeros. Tanto  $G'$ , quanto  $G''$  aumentam com o aumento da frequência, mas um aumenta mais rapidamente que o outro. No ponto em  $G' = G''$ , essa frequência é chamada de frequência de cruzamento ( $f_c$ ). A frequência de cruzamento diminui com o aumento do peso molecular ou concentração do polímero. Para uma solução de polímero a baixa frequência, os estresses elásticos relaxam, e os estresses viscosos dominam, e, como resultado,  $G''$  é maior que  $G'$  a frequências abaixo de  $f_c$ . Em contraste, para um gel, não há cruzamento entre  $G'$  e  $G''$ , e  $G'$  é maior que  $G''$  em toda a faixa de frequências. A menos que especificado de outra forma, a frequência de teste é de 0,04 - 7 Hz. Para uma revisão das propriedades físicas de materiais viscoelásticos e métodos de medição dessas propriedades, veja-se, por exemplo, "Polymers as Rheology Modifiers", editado por Schulz e Glass, ACS Symposium

Series 462, 1991; "An Introduction to Rheology," H.A. Barnes, J.F. Hutton e K. Walters, Elsevier, 1989; e Bohlin Rheometer Application Notes MRK544-01, MRK556-01, e MRK573-01.

Os termos "HA", "hialuronato", "hialuronano" são usados de maneira intercambiável e, a menos que declarado de outra forma, referem-se a qualquer HA, independentemente da fonte (fermentação bacteriana ou derivado de animal), do peso molecular, de sua forma física (por exemplo, gel ou fluido) ou do método de produção.

### Regimes

De acordo com a invenção, a viscosuplementação consiste numa única injeção intra-articular de viscosuplemento num período de 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26 semanas, numa quantidade suficiente para proporcionar um efeito terapêutico durante até 6 meses após a injeção. Em algumas formas de realização, o efeito terapêutico de uma única injeção de um volume maior é substancialmente o mesmo que o conseguido por três injeções (cada uma de 1/3 do volume maior) administradas no decorrer do tratamento. O regime de injeção única proporciona uma redução da dor articular durante até 6 meses após a injeção.

O efeito terapêutico pode ser avaliado por qualquer método adequado (veja-se, por exemplo, Altman *et al.* (1996) *Osteoarth. Cart.*, 4:217-243). Por exemplo, o efeito terapêutico pode ser avaliado medindo-se uma redução na dor articular. O grau de dor articular pode ser classificado de acordo com uma escala de Likert de cinco pontos (por exemplo, nenhuma, leve, moderada, grave, muito grave) ou numa escala analógica visual de 100 mm (VAS), conforme

descrita nos exemplos. Outros índices de dor adequados incluem o Questionário de Avaliação de Saúde (HAQ) (Fries *et al.* (1980) *Arthritis Rheumatol.*, 23: 137-145) e a Escala de Medição de Impacto da Artrite (AIMS) (Meenan *et al.* (1980) *Arthritis Rheumatol.*, 23: 146-154).

O efeito terapêutico também pode ser avaliado medindo-se a melhora no grau de prejuízo funcional. O prejuízo funcional pode ser medido usando-se um índice multidimensional validado segregado (SMI), como o índice de OA das Universidades de Western Ontário e McMaster (WOMAC™) para OA de quadril e joelho (Bellamy *et al.* (1988) *J. Rheumatol.* 34: 1833-1840; veja-se, também, Exemplos); ou um índice multidimensional agregado (AMI), como o índice Algo-Funcional (AFI) para quadril ou joelho (Lequesne *et al.* (1987) *Scand. J. Rheumatol. Supl.*, 65: 85-89).

O efeito terapêutico também pode ser avaliado por avaliação de estado global por um paciente ou médico. O estado global pode ser avaliado usando-se uma escala de Likert ou VAS, por exemplo, conforme descrito nos exemplos.

Indícios adicionais do efeito terapêutico podem incluir o exame da articulação (veja-se, por exemplo, Theiler *et al.* (1994) *Osteoarth. Cart.*, 2: 1-24), medidas baseadas no desempenho (veja-se, por exemplo, Rejeski *et al.* (1995) *Osteoarth. Cart.*, 3: 157-168), etc.

Em algumas formas de realização, o viscosuplemento é para administração na articulação do joelho na quantidade de  $6 \pm 2$  ml ou mais, por exemplo, 4, 4,25, 4,5, 4,75, 5, 5,25, 5,5, 5,75, 6, 6,25, 6,5, 6,75, 7, 7,25, 7,5, 7,75, 8 ml ou mais.

### Viscossuplementos

Um viscossuplemento à base de HA utilizável na invenção caracteriza-se por (i) e qualquer uma, ou todas as características em (ii) e (iii) como se segue:

- (i) o viscossuplemento tem uma semivida de residência de menos de 3 semanas;
- (ii) o viscossuplemento contém menos de 20 mg/ml de HA;
- (iii) 5% (p/p) ou mais do HA no viscossuplemento estão em forma de gel.

Numa forma de realização ilustrativa, o viscossuplemento usado na invenção é Synvisc®. Synvisc® contém  $8 \pm 2$  mg/ml de HA em duas formas: uma forma solúvel, hilano A (PM médio de 6.000 kDa), e uma forma de gel hidratada, hilano B, em solução fisiologicamente aceitável. A razão de hilano A/hilano B em Synvisc® é de 9:1 em peso de HA. Hilano A é um hialuronano solúvel em água modificado por reticulação covalente com pequenas quantidades de um aldeído, tipicamente formaldeído, ao passo que hilano B é hilano A adicionalmente reticulado por divinil sulfona. O fluido de hilano é hilano A hidratado, uma forma modificada de hialuronano com um pequeno número de reticulações que aumentam seu peso molecular médio e aumentam suas propriedades elastoviscosas. O gel de hilano é a forma hidratada de hilano B e é preparado por reticulação de hilano A numa rede polimérica contínua, usando divinil sulfona como um reagente de reticulação bifuncional.

Os viscossuplementos usados nos regimes apresentados pela invenção incluem viscossuplementos à base de HA com

uma semivida de residência intra-articular mais curta que 21, 20, 19, 18, 17, 16, 15, 14, 13, 12, 11, 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, e 3 dias. Em algumas formas de realização, a semivida de residência do viscosuplemento é de mais de 2, 3, 4, 5, 6 ou 7 dias.

Os viscosuplementos usados nos métodos da invenção podem ser adicionalmente caracterizados por que contêm menos de 20 mg/ml de HA, por exemplo, no intervalo de 1 - 15, 1 -10, 1 - 5, 5 -15, 5 -10, 10 -15, 6-10 e 7-9 mg/ml. A quantidade de HA numa dada composição pode ser determinada por qualquer método adequado, conforme descrito, por exemplo, nos exemplos.

As composições de viscosuplemento usadas na invenção podem ser caracterizadas ainda por pelo menos 10% em peso do HA no viscosuplemento estarem numa forma de gel. Por exemplo, em algumas formas de realização, o viscosuplemento compreende pelo menos 5%, 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 99% ou mais de gel de HA. Em algumas formas de realização, o viscosuplemento contém 10 - 90%, 10 - 75%, 10 - 50%, 10 - 40%, 10 - 25% de gel de HA. Em algumas formas de realização, a razão de gel de HA/fluido de HA no viscosuplemento contém faixas de 1:50 -10:1 (p/p), por exemplo, 1:50, 1:25, 1:15, 1:10, 1:9, 1:8, 1:7, 1:6, 1:5, 1:4, 1:3, 1:2; 1:1, 2:1, 3:1, 4:1, 5:1, 6:1, 7:1, 8:1, 9:1, e 10:1.

Os viscosuplementos para utilização na invenção também podem conter HA solúvel em água numa fase fluida, com um PM de HA no intervalo de 500 - 20.000 kDa, por exemplo, 500 - 1.000, 500 - 1.500; 500 - 3.000; 500 - 5.000; 500 - 7.000; 500 - 10.000; 500 - 15.000; 1.000 - 1.500; 1.000 - 3.000; 1.000 - 5.000; 1.000 - 7.000; 1.000 -

10.000; 1.000 - 15.000; 5.000 -10.000; e 10.000 -15.000 kDa.

O HA pode ser de origem animal, por exemplo, derivado de cristas de galos ou cordões umbilicais, ou de origem não animal, por exemplo, de fermentação bacteriana. O HA de fermentação bacteriana pode ser produzido conforme descrito, por exemplo, em Cooney *et al.* (1999) *Biotechnol. Prog.*, 15: 898-910. O HA de fermentação bacteriana também é comercialmente disponível (por exemplo, Shiseido, Japão; Sigma-Aldrich, EUA).

O HA é reticulado. Exemplos de reticuladores incluem aldeído, epóxido, poliazirilo, éter glicidílico (por exemplo, éter 1,4-butanodiol diglicidílico) e divinil sulfona.

Exemplos específicos de viscosuplementos utilizáveis na invenção incluem Synvisc®. Outros produtos adequados na invenção incluem os viscosuplementos descritos nas Patentes US nº 5.143.724, 4.713.448, 5.099.013, 5.399.351, 6.521.223, 5.827.937, e pedido de Patente US nº 60/533.429.

A preparação de hilanos e viscosuplementos incluindo hilano A e hilano B é descrita, por exemplo, nas Patentes US nº 5.143.724, 4.713.448, 5.099.013 e 5.399.351.

Os viscosuplementos excluem Durolane™ e/ou outros viscosuplementos com uma semivida de residência de mais de 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, ou 50 dias.

Os viscosuplementos também podem conter componentes activos ou inactivos adicionais, incluindo, por exemplo, os

fármacos anti-inflamatórios não esteróides (AINEs), por exemplo, Ibuprofen™, Diclofenac™ e Piroxicam™; anestésicos, por exemplo, Lidocaína™ e Bupivacaína™; analgésicos opiáceos, por exemplo, codeína e morfina; corticosteróides, por exemplo, dexametasona e prednisona; agentes antineoplásicos, como Metotrexato™, 5-fluorouracila e Paclitaxel™; e agentes antivirais, por exemplo, Acyclovir™ e Vidarabina™. Os viscosuplementos também podem conter componentes como células (por exemplo, condrócitos ou células tronco mesenquimais), proteínas, ADN, vitaminas ou outro material biologicamente activo desejável.

#### Utilizações e Administração

A invenção proporciona o viscosuplemento para utilização no tratamento de indivíduos com dor da articulação do joelho e desconforto associado a essa patologia. Exemplos dessas patologias incluem osteoartrite (primária (idiopática) ou secundária), artrite reumatóide, lesão de articulações (por exemplo, lesão por movimentos repetitivos), patologia da cartilagem (condromalácia) e estados pré-artríticos. A invenção é praticada em seres humanos em necessidade de tratamento para a dor da articulação do joelho.

O local de administração é o joelho.

Os exemplos a seguir apresentam formas de realização ilustrativas. Os Exemplos não limitam de forma alguma a invenção.



**EXEMPLOS****Exemplo 1: injeção intra-articular de Synvisc® em pacientes com OA**

Conduziu-se um estudo prospectivo de rótulo aberto para avaliar a segurança e eficácia (incluindo duração de acção) de injeções intra-articulares de 4 ml ou 6 ml de Synvisc® contra o actual regime de dosagem de três injeções intra-articulares de 2 ml de Synvisc® em pacientes ambulatoriais com OA tibiofemoral sintomática (dor de OA global no joelho de estudo no intervalo de 50 - 80 numa contagem VAS de 100 mm). Outros critérios para inclusão foram: idade de 40 anos ou mais; Kellgren-Lawrence grau II - III por raios X nos últimos 3 meses; ausência de efusão tensa, deficit mecânico ou trauma recente (< 2 anos). 100 pacientes (idade média de 61 anos variando de 59 a 66, 55% mulheres) foram aleatoriamente distribuídos em cinco grupos:

Grupo 1 - uma injeção de 6 ml;

Grupo 2 - uma injeção de 4 ml;

Grupo 3 - duas injeções de 4 ml a duas semanas de distância;

Grupo 4 - três injeções de 4 ml a uma semana de distância; e

Grupo 5 - o regime padrão de três injeções de 2 ml a uma semana de distância.

Os pacientes foram, então, acompanhados durante até 6 meses (nas semanas 2, 3, 8, 16 e 24). Os resultados de

avaliação primária e secundária usados são descritos a seguir.

#### **A. Auto-avaliação pelo paciente da dor de OA**

O resultado de eficácia primária desse estudo é para avaliar a eficácia da viscosuplementação com Synvisc® em pacientes com OA do joelho com relação ao alívio da dor de OA no joelho de estudo. Isto é medido numa VAS de 100 mm auto-avaliada pelo paciente, com resultados de nenhuma dor (0 mm) a dor extrema (100 mm) nas últimas 48 horas; realizada 24 semanas após a primeira injeção.

#### **B. Auto-avaliação global do paciente**

O paciente classificou o estado global do joelho alvo na VAS de 100 mm, que variava de muito bom (0 mm) a muito ruim (100 mm), levando em consideração todos os sinais e sintomas relacionados nas últimas 48 horas. As instruções exatas apresentadas ao paciente foram as seguintes: "Por favor, indique, usando a linha vertical abaixo, o estado geral global de seu joelho (em estudo) no momento desta visita. A contagem esquerda ou "0" indica "Muito bom", ao passo que a contagem "100" indica "Muito ruim"."

#### **C. WOMAC™**

O paciente completou a versão VAS do WOMAC™ conforme descrito em Bellamy et al. (1988) J. Rheumatol., 15(12): 1833-40. Essa escala é uma medida de estado de saúde tridimensional, específico para doença e auto-administrada. Sonda sintomas clinicamente importantes e relevantes para o paciente nas áreas de dor, rigidez e função física num total de 24 perguntas. O WOMAC™ foi apresentado aos pacientes na língua local e normalmente foi completado em

menos de 5 minutos. As subsecções do WOMAC™ são as seguintes.

A Secção A do WOMAC™ consiste em perguntas referentes aos níveis de dor durante a actividade, e as respostas são classificadas (pelo paciente) com uma VAS que varia de nenhuma dor (0 mm) a dor extrema (100 mm). A avaliação da dor é feita para os seguintes cenários:

1. Andar sobre uma superfície plana? [andando]
2. Subir ou descer escadas? [andando em escada]
3. À noite enquanto deitado na cama? [nocturna]
4. Sentado ou deitado? [repouso]
5. De pé? [suportando peso]

A subcontagem média para a Secção A do WOMAC baseou-se nas respostas a cada um dos componentes da Secção A.

A Parte B do WOMAC™ (Contagem de Rigidez) consiste em perguntas referentes à gravidade da rigidez durante a actividade, e as respostas são classificadas (pelo paciente) com uma VAS que varia de nenhuma rigidez (0 mm) a rigidez extrema (100 mm). A avaliação da rigidez é feita para os seguintes cenários:

1. Depois de acordar de manhã? [rigidez matutina]
2. Durante o restante do dia? [rigidez ocorrendo mais tarde no dia]

A subcontagem média para a Secção B baseou-se nas respostas a cada um dos componentes da Secção B.

A Parte C do WOMAC™ (Contagem de Rigidez) consiste em perguntas referentes ao prejuízo funcional durante a actividade, e as respostas são classificadas (pelo paciente) com uma VAS que varia de nenhuma dificuldade (0 mm) a dificuldade extrema (100 mm). A avaliação do prejuízo funcional foi feita para os seguintes cenários:

1. Descendo escadas? [rigidez matutina]
2. Subindo escadas? [rigidez ocorrendo mais tarde no dia]
3. Levantando-se? [levantando]
4. De pé? [de pé]
5. Dobrando-se até o chão? [dobrando]
6. Andando em superfícies planas? [andando no plano]
7. Entrando e saindo de um carro? [carro]
8. Fazendo compras? [fazendo compras]
9. Colocando meias/meias compridas [tirando meias/meias compridas]
10. Deitado na cama [deitado na cama]
11. Entrando/saindo do banho [entrando/saindo do banho]

12. Sentado [sentado]
13. Sentando/levantando do vaso sanitário  
[sentando/levantando do vaso sanitário]
14. Tarefas domésticas pesadas [tarefas pesadas]
15. Tarefas domésticas leves [tarefas leves]

A subcontagem média para a Secção C baseou-se nas respostas a cada um dos componentes da Secção C.

A alteração com relação à linha basal na contagem WOMAC™ total derivada das 3 seções do WOMAC™ (A, B e C) em todos os momentos após a primeira injeção foi analisada como um resultado secundário.

#### **D. Avaliação global de OA pelo médico**

Depois que o paciente completou as avaliações globais e o WOMAC™, o investigador classificou a condição global do joelho do paciente no momento da visita no intervalo VAS de 100 mm de muito boa (0 mm) a muito ruim (100 mm). Essa avaliação baseou-se nos sinais de doença do paciente, na capacidade funcional e no exame físico. O médico foi instruído para indicar a condição geral global do joelho do paciente no momento dessa visita usando uma linha apresentada com a extrema esquerda ("0") da linha indicando "muito bom" e a extrema direita ("100") indicando "muito ruim".

#### **E. Resultados**

Os resultados mostrando redução da dor (VAS; 0 correspondendo a nenhuma dor e 100 dor extrema nas últimas

48 horas) 24 semanas após a primeira injeção, em comparação com a linha basal, são mostrados no Quadro 1. A dor caiu 34,9 mm no grupo de 1 x 6 ml, em comparação com 36,7 mm no grupo de 3 x 2 ml, que foi o melhor. Nos grupos tratados com 1 x 4 ou 2 x 4 ml, essa diminuição foi menos dramática (apenas 24 mm de redução).

Quadro 1. Auto-avaliação pelo paciente da dor de OA  
(alteração com relação à linha basal)

Grupo	1 1 x 6 ml	2 1 x 4 ml	3 2 x 4 ml	4 3 x 4 ml	5 3 x 2 ml
Média	-34,9	-24,3	-24,0	-32,6	-36,7
Dev. Pad.	16,4	28,3	22,9	25,3	26,9
95% CI	-42,5, - 27,2	-37,2, - 11,5	-35,0, - 13,0	-44,4, - 20,8	-49,2, -24,1

Resultados de eficácia secundária incluindo melhora na dor, rigidez e prejuízo funcional, conforme medidos pelas avaliações de OA de joelho globais pelo índice de Osteoartrite das Universidades Western Ontário e McMaster (WOMAC™) (Quadro 2 para WOAMC® A), paciente (quadro 3) e médico (quadro 4), mostraram as mesmas tendências. Os grupos de tratamento foram classificados em ordem de eficácia, e os resultados são mostrados no Quadro 5. A duração prolongada do efeito observada no grupo 1 foi surpreendente. Em termos de segurança, 10% dos pacientes em cada grupo (1 x 6 ml e 3 x 2 ml) relataram efeitos secundários locais no joelho relacionados (dor, inchamento ou efusão) de intensidade mínima ou moderada.

Quadro 2. Contagem de dor WOMAC™ A (alteração com relação à linha basal)

Grupo	1 1 x 6 ml	2 1 x 4 ml	3 2 x 4 ml	4 3 x 4 ml	5 3 x 2 ml
Média	-25,8	-14,7	-16,6	-27,7	-25,6
Dev. Pad.	22,5	24,2	24,8	27,2	24,6
95% CI	-36,3, - 15,3	-25,7, -3,7	-28,5, -4,6	-40,5, - 14,9	-37,1, - 14,1

Quadro 3. Avaliação global pelo paciente (alteração com relação à linha basal)

Grupo	1 1 x 6 ml	2 1 x 4 ml	3 2 x 4 ml	4 3 x 4 ml	5 3 x 2 ml
Média	-31,3	-14,3	-19,8	-25,9	-24,4
Dev. Pad.	26	31	24	32,9	32,3
95% CI	-43,4, - 19,1	-28,4, -0,2	-31,2, -8,2	-41,3, - 10,5	-39,5, -9,3

Quadro 4. Avaliação global pelo médico (alteração com relação à linha basal)

Grupo	1 1 x 6 ml	2 1 x 4 ml	3 2 x 4 ml	4 3 x 4 ml	5 3 x 2 ml
Média	-30,7	-16,8	-22,9	-25,9	-27,7
Dev. Pad.	18,3	24,8	26,9	25,0	29,6
95% CI	-39,5, - 21,9	-28,1, -5,5	-35,8, - 10,0	-37,5, - 14,2	-41,6, - 13,8

Quadro 5. Classificações por grupo de tratamento

Grupo	1 1 x 6 ml	2 1 x 4 ml	3 2 x 4 ml	4 3 x 4 ml	5 3 x 2 ml
Dor pac.	2	4	5	3	1
Global pac.	1	5	4	2	3
Global méd.	1	5	4	3	2
WOMAC™ A	2	5	4	1	3
WOMAC™ B	4	5	3	2	1
WOMAC™ C	2	4	5	1	3

Nenhuma grande diferença foi observada entre os grupos de tratamento com relação à segurança, apenas que o Grupo 1 (1 x 6 ml) tinha, em geral, menos efeitos secundários. Esses resultados também sugerem que volumes de Synvisc® maiores de 2 ml podem ser administrados com segurança para reduzir a dor em pacientes com osteoartrite do joelho.

**Exemplo 2: Determinação da semivida de residência do Synvisc®****A. Incorporação de  $^{14}\text{C}$ -acetato no hialuronano de culturas de órgão de crista de galo**

Galos jovens (3 - 6 meses de idade) foram sacrificados por deslocamento cervical. Suas cristas foram completamente limpas com etanol (a 80%) e, então, excisadas na base usando-se um bisturi. O excesso de sangue foi pressionado para fora da crista e foi colocado numa solução salina estéril, transferido para uma coifa de fluxo laminar e enxaguado em mais três volumes de solução salina estéril. A crista foi, então, dissecada juntamente com a linha média vascular, e foram excisados segmentos rectangulares de tecido dérmico rosa. Os segmentos de tecido de crista foram finamente fatiados com um bisturi e colocados em meio Ventrex HL-1 (Ventrex Labs), 5 mg/ml de propionato de testosterona (Belmar Laboratories, Inwood, NY), 20  $\mu\text{Ci/ml}$  de  $^{14}\text{C}$ -ácido acético (ICN Radiochemicals, Irvine, CA, 1 mCi/ml), 0,1 mg/ml de penicilina, 0,1 mg/ml de estreptomicina e 0,1 mg/ml de fungizona (Hazelton, Lenexa, KS). Culturas individuais foram feitas em placas de Petri de plástico de 60 mm e continham aproximadamente 1,5 g de tecido de crista e 15 ml do meio. As culturas foram incubadas durante 72 horas num ambiente de  $\text{CO}_2$  a 5%, após o qual o tecido foi separado do meio por centrifugação durante 10 minutos a 10.000 g. O aglomerado pelota de tecido foi congelado numa placa de Petri de 30 mm. O tecido de crista radiomarcado congelado era tipicamente mantido no congelador durante 1-72 horas antes de se continuar o processamento para preparar hilano.



**B. Preparação do fluido de hilano radiomarcado**

Fibras de hilano A foram preparadas da seguinte maneira. Fatias de tecido de crista radiomarcado congelado foram colocadas num meio de reacção contendo acetona, formalina (solução de formaldeído a 37%), clorofórmio e acetato de sódio a uma razão de 0,75 g de tecido por 1 g de meio de reacção. Deixou-se que a reacção se processasse durante 18-20 horas, após as quais as fatias de tecido foram colhidas, lavadas três vezes em acetona e, então, secadas numa coifa de fluxo laminar. Quatro volumes de água destilada foram, então, adicionados às fatias de tecido seco para extrair hilano radiomarcado. Essa extracção aquosa foi realizada a 4 - 6 °C, após o que o extracto aquoso foi removido, e um volume idêntico de água foi adicionado de volta para uma segunda extracção. Dissolveu-se acetato de sódio sólido nos extractos aquosos a uma concentração de 1%, e as fibras de hilano foram precipitadas pela adição lenta em quatro volumes de etanol a 95%. As fibras de hilano radiomarcadas foram lavadas duas vezes em acetona e armazenadas no frio sob acetona.

Fibras de hilano A radiomarcadas (40,3 mg) foram reunidas e dissolvidas em 3,0 ml de solução salina tamponada com fosfato, livre de pirogénio e estéril (Biotrics Inc., Ridgefield, NJ, lote 122-1) por misturação lenta virando-se completamente durante 3 dias a 4 °C. Depois de completada a dissolução, o fluido de hilano radioactivo foi diluído cinco vezes com fluido de hilano não marcado. A mistura foi mantida durante mais cinco dias na mistura virada completamente a 4 °C.

**C. Preparação de gel radiomarcado**

Água tritiada (New England Nuclear, 100 mCi/ml) foi

misturada com a mistura de reacção usada para reticular o fluido de hilano (hilano A) em gel de hilano (hilano B). A reacção de reticulação foi realizada da seguinte maneira. Fibras de hilano A foram deixadas inchar na água tritiada durante aproximadamente três horas. Adicionou-se hidróxido de sódio concentrado, e a mistura foi vigorosamente agitada até que a solução estivesse homogénea (aproximadamente 15 minutos). Divinil sulfona foi diluída a uma concentração de 50% em água e adicionada à mistura de reacção com agitação vigorosa. A mistura de reacção foi deixada em repouso à temperatura ambiente (22 °C) durante mais 55 minutos, durante os quais as cadeias polissacarídicas foram reticuladas por divinil sulfona num gel polimérico contínuo (gel de hilano). Ao se realizar essa reacção em água tritiada, o trítio fica covalentemente ligado ao carbono na reticulação de divinil sulfonilo. A reacção foi terminada pela adição de dez volumes de solução salina livre de pirogénio e estéril para reduzir o pH abaixo de 12. A lavagem com salina também resulta em inchamento do gel de hilano até sua hidratação de equilíbrio. O gel de hilano foi lavado com salina pra remover divinil sulfona não reagida, trítio não reagido e outros produtos de reacção, e para levar o pH até 7. O excesso de salina foi separado do gel por filtração, após o que o gel foi passado através de uma agulha de 25 g 5 vezes para romper o gel sólido numa forma facilmente injectável. Nessa forma, o gel tritiado foi exaustivamente dialisado contra salina livre de pirogénio e estéril para remover qualquer trítio não covalentemente ligado.

#### **D. Preparação de uma mistura de gel de hilano-fluido de hilano**

Gel de hilano tritiado (3,04 g) foi directamente adicionado a 11,63 g de fluido de  $^{14}\text{C}$ -hilano, e a mistura

foi colocada num misturador Glen Mills durante 48 horas. A mistura foi, então, sucessivamente passada dez vezes através de agulhas de 18 g, 21 g e 25 g para assegurar a homogeneidade e a facilidade de injeção.

#### **E. Medições da concentração de HA e das quantidades de radiomarcador**

A concentração de polissacárido hilano nos componentes de gel e fluido da mistura foi determinada pelo procedimento de carbazol automatizado para ensaiar seu monómero ácido glucurónico repetido (3) e multiplicação por (2,07) para levar em conta o restante da cadeia polissacarídica. O gel de hilano foi hidrolisado antes da determinação do ácido glucurónico por adição de amostras pesadas de 0,1 g do gel a 0,2 ml de  $\text{H}_2\text{SO}_4$  a 1 N em tubos de tampa roscada firmemente fechados, e deixando-se que a hidrólise ácida se processasse durante 2 horas a 100 °C. As amostras, que foram completamente solubilizadas por esse procedimento, foram neutralizadas com 0,2 ml de NaOH a 1 N antes da análise do HA por um procedimento de carbazol.

O procedimento de carbazol envolve a medição da quantidade de ácido hexurónico (ácido glucurónico) na amostra. Um método para determinar a concentração de ácido hexurónico por um método colorimétrico foi relatado por Dische *et al.* (1947) *J. Biol. Chem.*, 167:189-198. O método baseia-se na reacção de cor de ácidos hexurónicos com ácido sulfúrico e carbazol. Um método actualizado e automatizado para a determinação de ácidos hexurónicos foi relatado por Balazs *et al.* (1965) *Anal. Biochem.*, 12: 547-558. As amostras são aquecidas num meio de ácido sulfúrico/borato e reagidas com carbazol. O carbazol reage com o ácido hexurónico para formar um complexo rosa com uma absorvância máxima a 530 nm. Para o método automatizado, as amostras e

os padrões são aspirados através de um analisador de fluxo contínuo usando-se uma bomba peristáltica. Os reagentes (ácido e carbazol) são adicionados e aquecidos numa câmara de reacção, e a absorvância é lida por um colorímetro de fluxo contínuo a 530 nm.

O teor de radioactividade do artigo de teste foi determinado por contagem de cintilação num contador de cintilação líquida ISOCAP 300 (Nuclear Chicago) usando-se Scintiverse Bio HP (Fisher Scientific) como um cintilante. Dados de CPM brutos foram convertidos em DPM usando-se o programa de razão de padrões externos do ISOCAP 300, com padronização contra Padrões de Finalização de Cintilação Líquida de Trítio, ou Padrões de Finalização de Cintilação Líquida de Carbono-14 (Amergham, Arlington Heights, II).

#### **F. Determinação da semivida de residência de Synvisc®**

A depuração de Synvisc® e de seus componentes de gel e fluido da articulação do joelho foi determinada em coelhos brancos neozelandeses pesando entre 2,5 e 3,5 kg. Os coelhos foram sacrificados em 24 horas, 3, 7 e 28 dias, respectivamente. O material radioactivo preparado essencialmente conforme acima descrito foi administrado como uma injeção intra-articular de 0,3 ml (0,086 ml/kg de peso corporal). Espera-se que esse nível de dose seja equivalente a uma única administração de 6 ml de Synvisc® a um ser humano de 70 kg. Quantidades correspondentes a serem administradas a outros animais também são directamente proporcionais ao peso do animal.

DPMS foram obtidas para cada tecido conforme acima delineado, e a DPM/mg foi calculada directamente, quando apropriado. As DPMS totais recuperadas e tanto DPMS, quanto DPM/mg para cada tecido articular foram calculadas

separadamente para cada animal. Calculou-se, então, a média desses valores para cada momento, que foi expressa como média  $\pm$  erro padrão da média. As médias calculadas foram relatadas a um mínimo de dois dígitos significativos, mesmo em situações em que os valores eram pequenos, e a variação de animal para animal era grande. A DPM média total recuperada da articulação em cada momento foi calculada pela média dos totais de animais individuais.

As determinações de semivida foram feitas por ajuste das médias para cada momento a uma função exponencial ( $Y = Ae^{kx}$ ). O erro padrão da estimativa foi obtido a partir do ajuste da curva e dividido por A para se obter o erro percentual esperado. Esse foi multiplicado pela semivida para se obter o erro esperado da semivida.

## **G. Resultados**

O componente de gel (hilano B) de Synvisc® é a fracção de meia-vida mais longa. Com base na depuração do material radioactivo, a semivida de residência do componente de gel foi determinada como sendo de 7,7 - 8,8 dias. Assim, até o dia 30, mais de 95% do gel seriam depurados. Cálculos teóricos, baseados na semivida experimentalmente determinada do gel, foram conduzidos para estimar a quantidade de gel que se esperaria estar na articulação humana após uma única injeção de 6 ml. Considerando-se que aproximadamente 6 mg de gel foram injectados no joelho de um indivíduo humano, 21 dias após a injeção, a quantidade de gel restante seria de aproximadamente 0,9 mg.

O componente fluido de Synvisc® (hilano A) é depurado mais rapidamente do que o componente de gel. A semivida do componente fluido foi determinada como sendo de 1,2 - 1,5 dias. Em 7 dias, 99% do material injectado foram depurados

da articulação de joelho dos coelhos.

Também foram conduzidos estudos de implante muscular em coelhos. O exame microscópico 7 e 30 dias após a implantação não detectou nenhum material de teste residual, o que é consistente com os estudos de depuração intra-articular.

## **REFERÊNCIAS CITADAS NA DESCRIÇÃO**

Esta lista de referências citadas pelo requerente é apenas para a conveniência do leitor. A mesma não faz parte do documento de Patente Europeia. Embora tenha sido tomado muito cuidado na compilação das referências, não se poderão excluir erros e omissões e o IEP não assume qualquer responsabilidade neste sentido.

### **Documentos de Patente citados na descrição**

- US 5143724 A [0036] [0037]
- US 4713448 A [0036] [0037]
- US 5099013 A [0036] [0037]
- US 5399351 A [0036] [0037]
- US 6521223 A [0036]
- US 5827937 A [0036]
- US 533429 P [0036]

### **Literatura não relacionada com patentes referida na descrição:**

- **BJELLE.** *Scand. J. Rheumatol. Suppl.*, 1982, vol. 43, 35-48 [0002]
- **REGINSTER.** *Rheumatology*, 2002, vol. 41 (1), 3-6 [0002]
- **BALAZS et al.** *J. Rheumatol.*, 1993, vol. 39, 3-9 [0003]
- **BALAZS et al.** *J. Rheumatol. Suppl.*, 1993, vol. 39, 3-9 [0004]
- **WOBIG.** *Clin. Ther.*, 1998, vol. 20 (3), 410-423 [0004] [0005]

- **ADAMS et al.** *Osteoarthritis and Cartilage*, 1995, vol.3, 213-225 [0005]
- **MORELAND.** *Am. Coll. Rheumatol. 57th Ann. Sci. Meeting*, 07 November 1993, 165 [0005]
- **PEYRON.** *J. Rheumatol.*, 1993, vol. 20 (39), 10-15 [0006]
- **SCALE et al.** *Curr. Ther. Res.*, 1994, vol. 55 (3), 220-232 [0006]
- **CHEVALIER.** *Am. Coll. Rheumatol. 64th Annual Scientific Meeting*, 30 October 2000 [0007]
- **ALTMAN et al.** *Osteoarthritis and Cart.*, 2004, vol. 12, 642-649 [0008]
- *Polymers as Rheology Modifiers.* ACS Symposium Series, 1991, 462 [0020]
- *An Introduction to Rheology.* Elsevier, 1999 [0020]
- **ALTMAN et al.** *Osteoarth. Cart.*, 1996, vol. 4, 217-243 [0023]
- **FRIES et al.** *Arthritis Rheumatol.*, 1980, vol. 23, 137-145 [0023]
- **MEENAN et al.** *Arthritis Rheumatol.*, 1980, vol. 23, 146-154 [0023]
- **BELLAMY et al.** *J. Rheumatol.*, 1988, vol. 34, 1833-1840 [0024]
- **LEQUESNE et al.** *Scand. J. Rheumatol.*, 1987, vol. 65, 85-89 [0024]
- **THEILER et al.** *Osteoarth. Cart.*, 1994, vol. 2, 1-24 [0026]
- **REJESKI et al.** *Osteoarth. Cart.*, 1995, vol. 3, 157-168 [0026]
- **COONEY et al.** *Biotechnol. Prog.*, 1999, vol. 15, 898-910 [0034]
- **BELLAMY et al.** *J. Rheumatol.*, 1988, vol. 15 (12), 1833-40 [0047]
- **DISCHE et al.** *J. Biol. Chem.*, 1947, vol. 167, 189-198 [0062]
- **BALAZS et al.** *Anal. Biochem.*, 1965, vol. 12, 547-558 [0062]

Lisboa, 28 de Outubro de 2013

## **REIVINDICAÇÕES**

1. Um viscosuplemento que compreende hialuronano reticulado (HA) para utilização no tratamento de dor da articulação do joelho num indivíduo humano por meio de um regime de tratamento, em que o viscosuplemento tem uma semivida de residência na articulação de menos de 3 semanas, e em que o regime de tratamento compreende uma única administração intra-articular do viscosuplemento numa quantidade suficiente para proporcionar um efeito terapêutico por até seis meses à articulação do joelho.

2. Utilização de um viscosuplemento que compreende hialuronano reticulado (HA) no fabrico de um medicamento para tratar a dor da articulação do joelho num indivíduo humano por meio de um regime de tratamento, em que o viscosuplemento tem uma semivida de residência na articulação de menos de 3 semanas, e em que o regime de tratamento compreende uma única administração intra-articular do viscosuplemento numa quantidade suficiente para proporcionar um efeito terapêutico por até seis meses à articulação do joelho.

3. O viscosuplemento para utilização de acordo com a reivindicação 1, ou a utilização de acordo com a reivindicação 2, em que a dor da articulação do joelho associada a osteoartrite é tratada.

4. O viscosuplemento para utilização de acordo com a reivindicação 1, ou a utilização de acordo com a reivindicação 2, em que o viscosuplemento contém menos de 20 mg/ml de HA, e 5% (p/p) ou mais de HA no viscosuplemento é numa forma de gel.

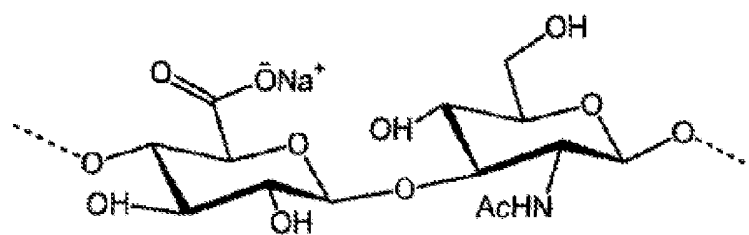
5. O viscosuplemento para utilização de acordo com a



reivindicação 1, ou a utilização de acordo com a reivindicação 2, em que o HA no viscosuplemento é de origem animal.

6. O viscosuplemento para utilização de acordo com a reivindicação 1, ou a utilização de acordo com a reivindicação 2, em que o HA no viscosuplemento é de origem bacteriana.

Lisboa, 28 de Outubro de 2013

**FIG. 1**