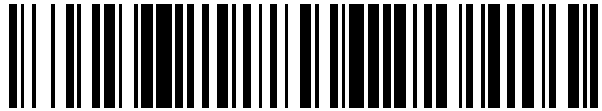


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 406 555**

51 Int. Cl.:

C08B 37/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **27.10.2004 E 04793318 (9)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **20.02.2013 EP 1681306**

54 Título: **Compuesto de ácido hialurónico, hidrogel del mismo y material para tratar articulaciones**

30 Prioridad:

29.10.2003 JP 2003368540

13.07.2004 JP 2004205682

22.09.2004 JP 2004274775

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
07.06.2013

73 Titular/es:

**TEIJIN LIMITED (100.0%)
6-7, MINAMIHONMACHI 1-CHOME CHUO-KU
OSAKA-SHI OSAKA 541-0054, JP**

72 Inventor/es:

**KITAZONO, EIICHI;
KANEKO, HIROAKI;
ITO, MASAYA;
FUKUTOMI, CHIAKI;
TSUZUKI, SAKI y
SUMI, YOSHIHIKO**

74 Agente/Representante:

IZQUIERDO FACES, José

ES 2 406 555 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

Compuesto de ácido hialurónico, hidrogel del mismo y material para tratar articulaciones.

5 CAMPO TECNICO

La presente invención se refiere a un compuesto de ácido hialurónico que es un producto de la reacción entre ácido hialurónico y una fosfatidiletanolamina, un hidrogel del mismo y un material para tratar articulaciones.

10 ANTECEDENTES DE LA TECNICA

15 Un cartílago es uno de un pequeño número de tejidos libres de vasos sanguíneos in vivo, y se dice que es difícil de reconstruir su tejido original. Para suprimir la aparición de osteoartritis basada en el cambio localizado del cartílago a un estado mórbido, dicho defecto del cartílago causado por una herida externa u osteocondropatía de disección, se han probado varios remedios.

20 Se ha intentado la implantación de condrocitos autólogos (ACI) en la que solamente la célula de un condrocito obtenida por muestreo de una célula madre mesenquimal de condrocitos autólogos o células de la médula ósea y diferenciándolo, o el condrocito cultivado en un supercántigo es implantado a una región defectuosa del cartílago (consulte N Engl J Med. 331, 889-95 (1994), J Bone Joint Surg Am. 76, 579-92 (1994) and Artificial Organs. 25, 172-179 (2001)).

25 Para cultivar un condrocito autólogo in vitro, se intenta enérgicamente un cultivo 3-D para crear un ambiente cercano al ambiente in vivo, y se usa como supercántigo un material que es reconocido como seguro in vivo, como el colágeno, el ácido alginico o la fibrina. En cuanto al colágeno de estos, Ochi y otros han desarrollado un método usando aterocolágeno y han empezado las pruebas clínicas (JP-A 2001-293081).

30 Aunque el colágeno muestra bio-absortividad, tiene los problemas de que es difícil de eliminar su antigenicidad y no se puede negar la posibilidad de su infección con un virus desconocido.

35 En contraposición a esto, el ácido hialurónico es un constituyente de una matriz extracelular que forma el cartílago de una articulación y tiene alta afinidad con el cartílago. Además, como el ácido hialurónico puede ser formado por fermentación sin una materia prima derivada de un animal, la posibilidad de infección con un virus desconocido es baja al contrario que el colágeno. Por lo tanto, los estudios del tratamiento de una herida en el cartílago de una rodilla usando ácido hialurónico están ahora en marcha para el tratamiento médico regenerativo.

40 La Patente US 5939323, J. Biomed. Mater. Res. 42, 172-81 (1998), J. Biomed. Mater. Res. 46. 337-46 (1999) y J. Orthop. Res. 18, 773-780 (2000) divulgan ácido hialurónico esterificado con bencilo. La JP-A 7-97401 divulga ácido hialurónico reticulado con bisepóxido. Además, la Patente US 4282865 y la Patente US 4605691 divulgan ácido hialurónico reticulado con divinilsulfona, la JP-A 60-130601 divulga ácido hialurónico reticulado con formaldehído y la JP-A 60-130610 divulga ácido hialurónico reticulado con formaldehído. Se conocen otros ácidos hialurónicos reticulados con hidracida.

45 Sin embargo los agentes de reticulación se usan para mejorar la bio-absortividad del ácido hialurónico en todos los estados de la técnica anteriores. Como estos agentes de reticulación no son bio-absortivos, la seguridad de los agentes preocupa, y se desea un material altamente seguro para tratar el cartílago de una articulación. El término "reticulación" como se usa en la presente implica no sólo la reticulación química por enlace covalente sino también la reticulación iónica por interacción electroestática y la reticulación física por la fuerza de van der Waals o interacción hidrofóbica.

50 DESCRIPCION DE LA INVENCION

55 Es un objeto de la presente invención el proporcionar un hidrogel seguro de un compuesto de ácido hialurónico que tiene una bio-adaptabilidad excelente.

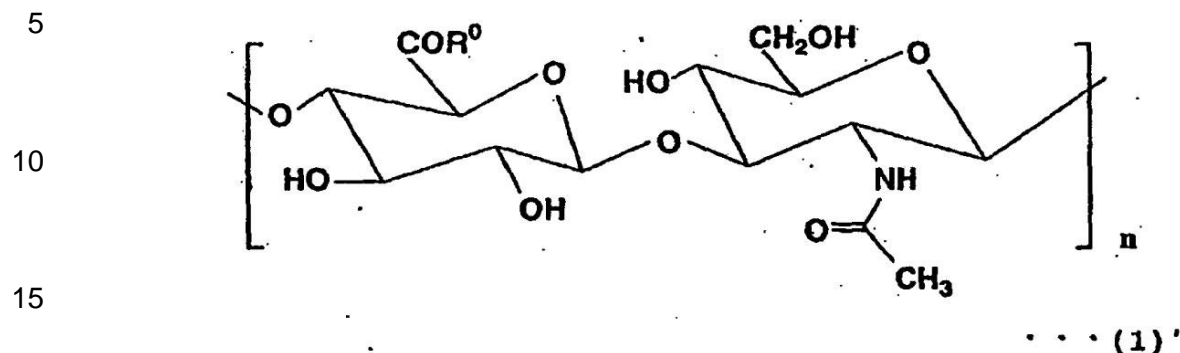
Es otro objeto de la presente invención el proporcionar un hidrogel de un compuesto de ácido hialurónico los suficientemente fuerte para ser usado en una región bajo una carga in vivo.

60 También se divulga una forma moldeada del compuesto de ácido hialurónico anterior que es insoluble en un medio acuoso.

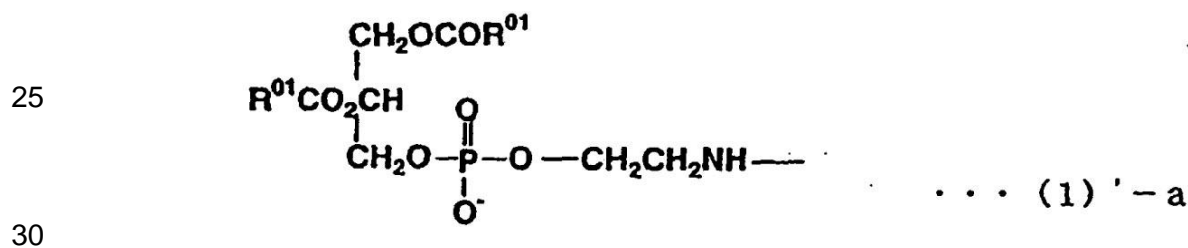
Es un objeto adicional de la presente invención proporcionar un material para tratar articulaciones que es el hidrogel anterior de un compuesto de ácido hialurónico de la presente invención.

65 Otros objetos y ventajas de la presente invención se harán evidentes de la siguiente descripción.

De acuerdo con la presente invención, primeramente, los objetos y ventajas anteriores de la presente invención se alcanzan por un hidrogel de un compuesto de ácido hialurónico representado por la siguiente fórmula (1)':

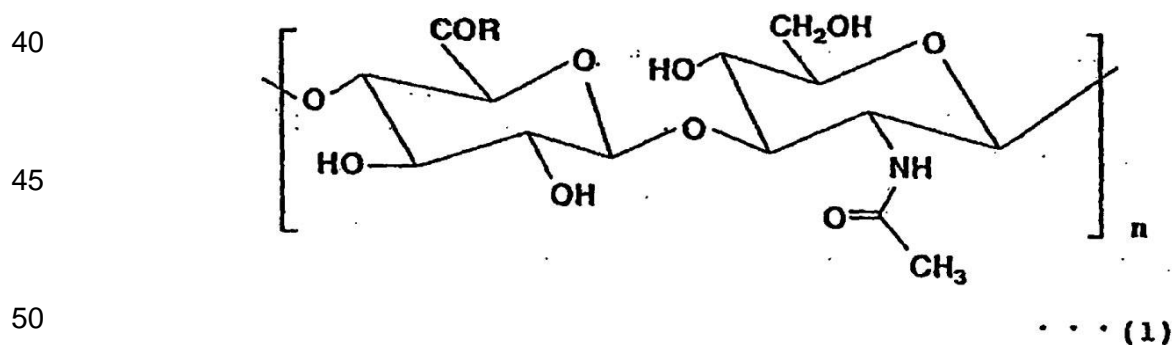


20 donde R⁰ es un grupo representado por la fórmula siguiente (1)'-a, -OH o -ONa,



35 donde R⁰¹ es un grupo alquenilo que tiene de 10 a 28 átomos de carbono, y n es un entero de 50 a 50.000, con la condición que del 1 al 100% de R sea el grupo representado por la fórmula anterior (1)'-a.

40 De acuerdo con la presente invención, en el segundo lugar, los objetos y ventajas anteriores de la presente invención se logran por un material para tratar articulaciones que comprende un hidrogel de un compuesto de ácido hialurónico representado por la fórmula siguiente (1):



BREVE DESCRIPCION DEL DIBUJO

55 La Figura 1 muestra la comparación de la evaluación histológica en la articulación de una rodilla de conejo 8 semanas después de una operación entre el Ejemplo 5 y el Ejemplo Comparativo 5.

MEJOR MODO DE LLEVAR A CABO LA INVENCION

60 El compuesto de ácido hialurónico del hidrogel de la presente invención está representado por la fórmula anterior (1)' y el compuesto de ácido hialurónico usado como un material para tratar articulaciones de la presente invención está representado por la fórmula anterior (1). En la fórmula anterior (1), R es un grupo fosfatidil etanolamino representado por la fórmula (1)'-a, -OH o -ONa. Y, en la fórmula anterior (1)', R⁰ es un grupo fosfatidil etanolamino representado por la fórmula (1)'-a, -OH o ONa, con la condición que de un 1 a un 100% de R o R⁰ debe ser un grupo fosfatidil etanolamino. Cuando el grupo fosfatidil etanolamino representa menos del 1% de R o R⁰, no se logra el objeto de la presente invención. R es un grupo alquilo o alquenilo que tiene de 10 a 28 átomos de carbono,

65

preferiblemente de 14 a 20 átomos de carbono, y R^0 es un grupo alqueno que tiene de 10 a 28 átomos de carbono, preferiblemente de 14 a 20 átomos de carbono. n es un entero de 50 a 50.000, preferiblemente de 300 a 30.000, más preferiblemente de 1.000 a 10.000.

5 Ejemplos del grupo alquilo que tienen de 10 a 28 átomos de carbono representados por R incluyen decilo, undecilo, laurilo, tridecilo, tetradecilo, pentadecilo, hexadecilo, heptadecilo, estearilo y elcosanilo. Ejemplos de R o R^0 que es el grupo alqueno que tiene de 10 a 28 átomos de carbono incluyen grupos alqueno que tienen de 1 a 3 enlaces no saturados carbono-carbono, que se corresponden con los grupos alquilo anteriores, como el grupo oleilo.

10 El compuesto representado por las fórmulas anteriores (I) o (I)' es preferiblemente un compuesto de la fórmula (I)-a en que grupo fosfatidil etanolamina. Cuando el grupo fosfatidil etanolamina cuenta con menos de un 1% de R, el objeto de la presente invención no se logra. R es un grupo alquilo o un grupo alqueno que tiene de 10 a 28 átomos de carbono, preferiblemente de 14 a 20 átomos de carbono, y n es un entero de 50 a 50.000, preferiblemente de 300 a 30.000, más preferiblemente de 1.000 a 10.000.

15 Ejemplos del grupo alquilo que tienen de 10 a 28 átomos de carbono representados por R incluyen decilo, undecilo, laurilo, tridecilo, tetradecilo, pentadecilo, hexadecilo, heptadecilo, estearilo y elcosanilo. Ejemplos del grupo alqueno que tiene de 10 a 28 átomos de carbono incluyen grupos alqueno que tienen de 1 a 3 enlaces no saturados carbono-carbono, que se corresponden con los grupos alquilo anteriores, como el grupo oleilo.

20 El compuesto representado por la fórmula anterior (I) es preferiblemente un compuesto de la fórmula (I)-a en la que dos grupos R^1CO son grupos oleilos.

25 El ácido hialurónico representado por la fórmula anterior (I) puede ser preparado reaccionando ácido hialurónico con una fosfatidil etanolamina.

30 El ácido hialurónico puede ser extraído de un tejido animal o fabricado por fermentación. Una cepa usada en la fermentación de microorganismos que tiene la capacidad de producir ácido que pertenece al género *Streptococcus*, como el *Streptococcus equi* FM-100 (JP-A 63-123392) o el *Streptococcus equi* FM-300 (JP-A 2-234689) todos los cuales son conocidos. También se pueden usar lo que es preparado cultivando y refinando variantes de los mismos. El peso molecular del ácido hialurónico es preferiblemente de 1×10^5 a 1×10^7 . El término "ácido hialurónico" como se usa en la presente incluye sales de metal alcali como sales de sodio, potasio y litio de ácido hialurónico.

35 Además, la fosfatidil etanolamina puede ser extraída de un tejido animal o sintetizada. Ejemplos de fosfatidil etanolamina incluyen dilauroilfosfatidil etanolamina, dimiristoil fosfatidil etanolamina, dipalmitoil fosfatidil etanolamina, distearoil fosfatidil etanolamina, diaraquidoil fosfatidil etanolamina, dibehenoil fosfatidil etanolamina, dilignocerol fosfatidil etanolamina, dicerotioil fosfatidil etanolamina, dimontanoil fosfatidil etanolamina, dilaurooleoil fosfatidil etanolamina, dimiristooleoil fosfatidil etanolamina, diximenoil fosfatidil etanolamina, dilinolenoil fosfatidil etanolamina, dihiragonoil fosfatidil etanolamina, diaraquidonoil fosfatidil etanolamina y didocosahexaenoil fosfatidil etanolamina. Fuera de estos se prefiere particularmente la dioleoil fosfatidil etanolamina desde el punto de vista de la solubilidad.

40 La fosfatidil etanolamina es una sustancia segura para un cuerpo vivo y promueve la reticulación como la reticulación física del ácido hialurónico como el compuesto de ácido hialurónico de la presente invención haciendo uso del enlace de hidrógeno o la interacción hidrofóbica. Por lo tanto, el compuesto de ácido hialurónico puede ser formado en el hidrogel de la presente invención o una forma moldeada insoluble que será descrita en la presente más adelante por la reticulación anterior.

45 La cantidad de la fosfatidil etanolamina es preferiblemente de 1 a 100 equivalentes en base a 100 equivalentes del grupo carboxilo del ácido hialurónico. Cuando la cantidad es más pequeña que 1 equivalente, el compuesto de ácido hialurónico obtenido no forma un hidrogel. Cuando la cantidad es mayor de 50 equivalentes, la hidrofobicidad del compuesto de ácido hialurónico formado se vuelve alta y se forma materia insoluble, haciendo de este modo difícil formar un hidrogel. Particularmente cuando la cantidad es de 51 equivalentes o más, el compuesto de ácido hialurónico formado muestra alta insolubilidad en un medio acuoso. Se debe entender que el término "medio acuoso" como se usa en la presente significa agua, solución salina fisiológica, una solución reguladora o una solución acuosa que contiene un solvente orgánico como un alcohol, y el término "insolubilidad" significa que el compuesto de ácido hialurónico reside en un cuerpo vivo durante cierto periodo de tiempo, se descompone gradualmente después de eso y es absorbido en el cuerpo vivo al final.

50 Cuando un compuesto se inyecta en la región de la articulación de la rodilla de un cuerpo vivo bajo una carga como la articulación de la rodilla de un animal, por ejemplo, un ser humano y tiene un módulo elástico de 200 Pa o menos, es difícil mantener la forma del compuesto. Por el contrario, como el hidrogel de un compuesto de ácido hialurónico de la presente invención tiene un módulo elástico alto de 200 Pa o más, es útil como material para tratar una lesión en el cartílago de una rodilla.

65

5 Cuando el compuesto de ácido hialurónico muestra una insolubilidad suficientemente alta en un medio acuoso, puede ser moldeada en una forma, por ejemplo, un material poroso como una esponja, una tela no tejida o película. Incluso cuando el compuesto de ácido hialurónico es insoluble en un medio acuoso y su forma moldeada es insertada en el cuerpo, puede ser hinchado con un fluido corporal después de 2 ó 3 semanas para volverse un gel.

10 Para fabricar la forma moldeada se pueden emplear métodos de secado por liofilización, formación de película seca, formación de película húmeda, hilado de coagulación, lapso de unión, soplado en fusión e hilado a nivel.

15 Las formas moldeadas obtenidas por los métodos anteriores se pueden usar en campos de aplicación que requieren la restauración de un cartílago usándolas como una forma moldeada que tiene una cierta forma, particularmente campos de aplicación que requieren alta remanencia, como un agente para tratar una articulación, un agente para evitar la adhesión de un tejido después de una operación o un agente para mantener una piel húmeda.

20 Como se ha descrito anteriormente, el compuesto de ácido hialurónico y el hidrogel del compuesto de ácido hialurónico pueden ser usados ventajosamente como un material para tratar articulaciones que tiene capacidad para restaurar el cartílago.

20 Ejemplos

25 Los siguientes ejemplos se proporcionan con el propósito de ilustrar adicionalmente la presente invención pero no deben ser tomados de ninguna manera como limitativos.

30 El hialuronato sódico usado en los Ejemplos 1 a 4 a continuación es hialuronato sódico derivado del género *Streptococcus* y que tiene un peso molecular medio de 1.000.000, que es equivalente a un compuesto de la fórmula (1) en el que n es 3.500. Como otros reactivos se usaron tetrahidrofurano, 0,1M de HCl, 0,1M de NaOH, 1-etil-3[3-dimetilamino]propilo]-carbodimida (EDC), 1-hidroxibenzotriazol (HOBt) y hidrocloreuro de L-leucina metil éster (de Wako Pure Chemical Industries, Ltd.). L- α -dioleoilfosfatidil etanolamina (COATSOME ME-8181) (de NOF Corporation) y un 3% de atelocolágeno (de Koken Co., Ltd.).

35 Ejemplo 1

40 Se disolvieron 110 mg (0,000033 mol) (10 equivalentes en base a 100 equivalentes del grupo carboxilo de ácido hialurónico) de L- α -dioleoilfosfatidil etanolamina en 200 ml de una solución 1/1 de tetrahidrofurano y agua (v/v). Se añadieron 500 mg de hialuronato sódico a esta solución, y 0,1M de HCl y 0,1M de NaOH a la solución resultante para ajustar su pH a 6,8. Se disolvieron 30 mg (0,000033 mol) de 1-etil-3[3-dimetilamino]propilo]-carbodimida (EDC) y 25 mg (0,000033 mol) de 1-hidroxibenzotriazol (HOBt) en 10 ml de una solución 1/1 de tetrahidrofurano y agua, y la solución resultante se añadió a un sistema de reacción y se agitó durante la noche. Después de la agitación, la solución obtenida fue purificada por diálisis y liofilizada para obtener un producto de interés. La formación del producto de interés se confirmó por ¹NHMR (JNM-alpha400 de JEOL Ltd.).

45 Se disolvieron 30 mg de este producto liofilizado en 970 mg de agua de intercambio de iones para preparar un hidrogel que tenía una concentración del 3% por peso. Para medir el módulo elástico complejo y la fluencia cortante de este hidrogel a 37° C, se usó el Rheometer RFIISRV (DE TA Instrument CO., Ltd.). Los resultados se muestran en la Tabla 1. El término "módulo elástico complejo" como se usa aquí significa un indicativo constante de la proporción del estrés a la tensión de un cuerpo elástico, y el término "fluencia cortante" significa el máximo estrés al que una estructura de un gel se mantiene cuando se aplica estrés de corte.

50 Ejemplo 2

55 Se repitió el procedimiento del Ejemplo 1 excepto que se usaron 440 mg (0,00012 mol) (40 equivalentes en base a 100 equivalentes del grupo carboxilo de ácido hialurónico) de L- α -dioleoilfosfatidil etanolamina, 120 mg (0,000132 mol) de 1-etil-3[3-dimetilamino]propilo]-carbodimida (EDC) y 100 mg (0,000132 mol) de 1-hidroxibenzotriazol (HOBt). Los resultados se muestran en la Tabla 1.

Ejemplo Comparativo 1

60 Se obtuvo un hidrogel añadiendo 5 ml de agua de intercambio de iones a 50 mg de hialuronato sódico y agitándolos. La evaluación de las propiedades físicas del hidrogel se llevó a cabo de la misma manera que en el ejemplo q. Los resultados se muestran en la Tabla 1.

Ejemplo Comparativo 2

Se realizaron experimentos de reelaboración con referencia a la Patente US 4.937.270. A continuación se da una descripción detallada de los experimentos.

Se disolvieron 400 mg de hialuronato sódico en 40 ml de agua y el pH de la solución resultante se ajustó a 4,75 con 0,1M de HCl

Se añadieron 153 mg (0,80 mmol) de 1-etil-3[3-dimetilamino]propilo]-carbodimida (EDC) y 182 mg (1,0 mmol) de hidrocloreuro de L-leucina metil éster a la solución anterior y se agitó durante 5 horas. Después de la agitación, la solución resultante fue purificada por diálisis y liofilizada para obtener un producto de interés. La evaluación de las propiedades físicas del producto de interés se llevó a cabo de la misma manera que en el Ejemplo 1. Los resultados se muestran en la Tabla 1.

Ejemplo Comparativo 3

El aterocolágeno se midió bajo las mismas condiciones que en el Ejemplo 1 excepto que se usó aterocolágeno. Los resultados se muestran en la Tabla 1.

Tabla 1

	Material	Módulo elástico complejo (Pa)	Fluencia cortante (Pa)
Ejemplo 1	Hialuronato de L- α -dioleoilfosfatidil etanolamina (10mol%)	421	1.083
Ejemplo 2	Hialuronato de L- α -dioleoilfosfatidil etanolamina (40mol%)	902	1.734
Ejemplo Comparativo 1	Hialuronato sódico	5	18
Ejemplo Comparativo 2	Acido hialurónico reticulado	513	515
Ejemplo Comparativo 2	Aterocolágeno	293	919

Resulta obvio de la Tabla 1 que el hialuronato de L- α -dioleoilfosfatidil etanolamina es superior al hialuronato sódico y al aterocolágeno en términos de módulo elástico complejo y fluencia cortante. Cuando se compara con el ácido hialurónico reticulado, muestra las mismas o más altas propiedades químicas.

Ejemplo 3

Se disolvieron 100 mg de hialuronato sódico en 40 ml de una solución 1/1 de tetrahidrofurano y agua (v/v). Se añadieron 154 mg (0,00021 mol) (70 equivalentes en base a 100 equivalentes del grupo carboxilo de ácido hialurónico) de L- α -dioleoilfosfatidil etanolamina a esta solución, y se añadieron además 0,1M de HCl y 0,1M de NaOH a la solución para ajustar su pH a 6,8. Se disolvieron 42 mg (0,000231 mol) de 1-etil-3[3-dimetilamino]propilo]-carbodimida (EDC) y 35 mg (0,000231 mol) de 1-hidroxibenzotriazol (HOBt) en 10 ml de una solución 1/1 de tetrahidrofurano y agua (v/v), y la solución resultante se añadió a un sistema de reacción. En este punto, se añadieron 0,1M de NaOH para mantener el pH del sistema de reacción a 6,8. Después de esto, la mezcla resultante se agitó a lo largo de la noche, se dializó durante 3 días y se liofilizó para obtener un producto de interés (esponja). La formación del producto de interés se confirmó por ^1H NMR (JNM-alpha400 de JEOL Ltd.).

Se llevó a cabo una prueba de solubilidad por el método siguiente. Se sumergieron 20 mg del producto de interés obtenido en 5 ml de solución salina reguladora de ácido fosfórico para llevar a cabo la prueba de solubilidad durante 4 semanas mientras el producto se dejó a temperatura ambiente y se comprobó su solubilidad visualmente. Los resultados de la prueba de solubilidad se muestran en la Tabla 2.

Ejemplo 4

Se obtuvo un producto de interés (esponja) de la misma manera que en el Ejemplo 1 excepto que se usaron 223 mg (0,0003 mol) (100 equivalentes en base a 100 equivalentes del grupo carboxilo de ácido hialurónico) de L- α -dioleoilfosfatidil etanolamina, 60 mg (0,00033 mol) de 1-etil-3[3-dimetilamino]propilo]-carbodimida (EDC) y 50

mg (0,00033 mol) de 1-hidroxibenzo-triazol (HOBt). Los resultados de una prueba de solubilidad se muestran en la Tabla 2.

Ejemplo Comparativo 4

Se sumergieron 20 mg de hialuronato sódico en 5 ml de solución salina fisiológica reguladora de ácido fosfórico para llevar a cabo una prueba de solubilidad durante 4 semanas mientras se dejó a temperatura ambiente y se comprobó su solubilidad visualmente. Los resultados se muestran en la Tabla 2.

Tabla 2

	Contenido de L- α - dioleoifosfatidil etanolamina (equivalentes) ¹⁾	Un día	Una semana	Dos semanas	Cuatro semanas
Ejemplo 3	70	○	○	○	○
Ejemplo 4	100	○	○	○	○
Ejemplo Comparativo 4	0	x	x	x	x
○: no disuelto Δ: parcialmente disuelto x: completamente disuelto ¹⁾ en base a 100 equivalentes del grupo carboxilo del ácido hialurónico					

Resulta obvio de la Tabla 2 que la insolubilidad en un líquido acuoso de hialuronato de L- α -dioleoifosfatidil etanolamina (contenido: 70, 100 equivalentes, respectivamente) es más alta que la del hialuronato sódico.

El etanol desinfectante, un 10% de solución de formalina reguladora neutra y una solución O de safranina usados en el Ejemplo 5 a continuación son productos comercialmente disponibles de Wako Pure Chemical Industries, Ltd., Fast Green FCF es un producto comercialmente disponible de Polyscience Co., Ltd., el ácido de etilenediamina-N,N,N',N'-tetraacético, la sal tetrasódica y el tetrahidrato (EDTA) son productos comercialmente disponibles de Dojin Kagaku Kenkyusho Co., Ltd., el pentobarbital (referido como "Nenbutal" en lo sucesivo) es un producto comercialmente disponible de Dainippon Pharmaceutical Co., Ltd., el 1% de xilocina es un producto comercialmente disponible de Banyu Pharmaceutical Co., Ltd., y una tintura de yodo es un producto comercialmente disponible de Yoshida Pharmaceutical Co., Ltd. Un conejo blanco de Nueva Zelanda (referido como "conejo NZW" en lo sucesivo) usado en el Ejemplo 5 era macho, comprado de Nippon SLC Co., Ltd. y se crió en una jaula bajo condiciones normales hasta que su peso era de 3,0 a 3,5 kg. La edad del conejo después de la operación era de 24 a 28 semanas.

Ejemplo 5

La evaluación biológica del hidrogel de ácido hialurónico que tiene una concentración del 3% por peso preparado en el Ejemplo 1 se llevo a cabo por el método siguiente. Se administró pentobarbital a la vena articular del conejo NZW criado bajo condiciones normales, y la siguiente operación se hizo en el conejo mientras estaba generalmente anestesiado. Las regiones alrededor de la articulación de la rodilla de una pata posterior en ambos lados fueron afeitadas y desinfectadas con etanol, y se administró xilocina varias veces localmente e intramuscularmente. El lado interno de la articulación de la rodilla fue abierta por incisión y la ranura de la rótula femoral del fémur fue expuesta dislocando la rótula. Una región defectuosa cilíndrica que tiene un diámetro interior de 5 mm y una profundidad de 5 mm se formo en la ranura de la tróclea alrededor de 5 mm por encima del ligamento colateral en el lado interno con un taladro de operación para retirar todas las capas del cartílago de la articulación de la rodilla. El hidrogel anteriormente obtenido se insertó en la región defectuosa, y la rótula se colocó en su posición original para suturar el músculo. Después de que se echara penicilina en la parte afectada para la prevención de infecciones, la piel fue suturada. Finalmente, la parte suturada fue desinfectada con una tintura de yodo, y se devolvió al conejo a su jaula y se crió bajo condiciones normales. Ocho semanas después de la operación fue sacrificado para extraer la región defectuosa que fue entonces sumergida en un 10% de solución de formalina reguladora neutra, fijada y evaluada histológicamente. El tejido fijado fue desengrasado, descalcificado con EDTA y envuelto en parafina, y una porción cercana al centro de la región defectuosa fue rebanada en plano sagital para preparar una muestra. La muestra preparada fue tintada con safranina O y evaluada para los objetos siguientes usados de grados de puntuación histológicamente.

Los grados de puntuación usados para la anterior evaluación histológica se basaron en Makino T. y otros, Kobe J Med Sci. 48:97-104 (2002) que es una modificación de Wakitani S y otros, J Bone Joint Surg Am. 76, 579-92 (1994). La Tabla 3 muestra los objetos de evaluación histológica y sus puntuaciones.

5 La puntuación total es de 14 puntos, y el sistema de grado de 3 a 5 se emplea de acuerdo con los objetos de evaluación. Como la capacidad de restauración del tejido se vuelve más alta, es decir, el tejido es restaurado a tal extensión que está cerca de su estado normal, la puntuación se vuelve cercana a 14 puntos. Es decir, los objetos son la morfología de Células restauradas (0 a 4 puntos), la tinción de la matriz (0 a 3 puntos), la regularidad de la superficie (0 a 3 puntos), el grosor del cartílago (0 a 2 puntos) y la integración del donante con el huésped (0 a 2 puntos). En este método, la puntuación se vuelve más alta a medida que el tejido se vuelve más cercano a su estado normal.

15 Los resultados de la evaluación histológica extrayendo la región defectuosa 8 semanas después de la operación se muestran en la Figura 1. Se observó que el cartílago restaurado 8 semanas después de la operación se volvió un cartílago casi como hialino y que se produjo bien una matriz. La conexión con una región normal fue satisfactoria y se observó la continuidad de los tejidos.

Ejemplo Comparativo 5

20 Se formó una región defectuosa en la ranura de la tróclea del fémur de la misma manera que en el Ejemplo 5, se insertó un gel de atelocolágeno (marca registrada) (tipo I de Koken Co., Ltd.) en la región anterior para restaurarlo, y la región defectuosa se extrajo 8 semanas después de la operación para hacer la evaluación histológica. Los resultados se muestran en la Figura 1.

25 Cuando se compara el Ejemplo Comparativo 5 con el Ejemplo 5, aunque no hubo diferencia en la capacidad de tinción de la matriz entre ellos, la superficie no era suave y el hueso inferior del cartílago no se restauró en absoluto.

30 Tabla 3 evaluación histológica en la región defectuosa del cartílago

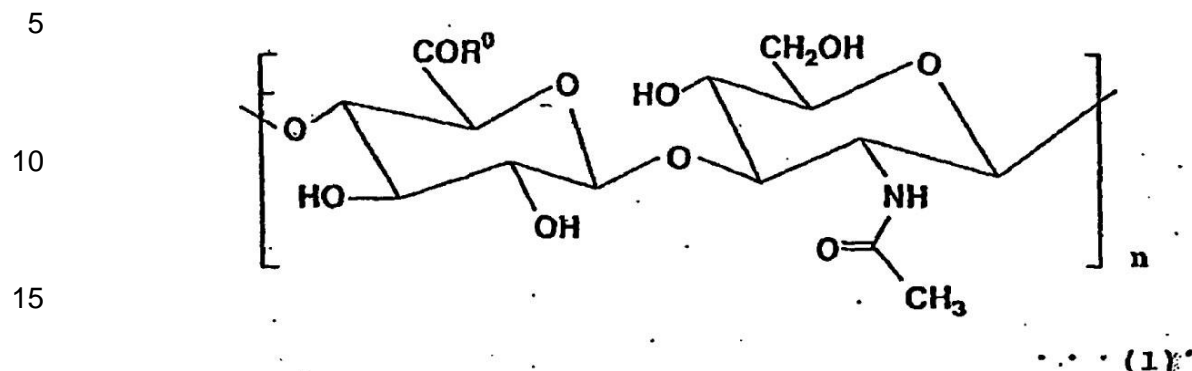
35	A. Morfología celular	4 cartílago hialino 3 en su mayor parte cartílago hialino 1 en su mayor parte no cartílago 0 sólo no cartílago
40	B. Tinción de la matriz con safranina-O	3 normal (en comparación con el huésped) 2 ligeramente reducido 1 significativamente reducido 0 sin tinción
45	C. Regularidad de la superficie *	3 lisa (> 3/4) 2 moderado (1/2 a 3/4) 1 irregular (1/4 a 1/2) 0 severamente irregular (<1/4)
50	D. Grosor del cartílago **	2 > 2/3 1 1/3 a 2/3 0 < 1/3
55	E. Integración del donante con el cartílago adyacente huésped	2 ambos bordes integrados 1 un borde integrado 0 ambos bordes no integrados
	total A-E	0-14
60	* Área total lisa del cartílago reparador en comparación con el área completa de defecto del cartílago. ** Grosor medio del cartílago reparador en comparación con el cartílago circundante.	

Se puede confirmar de los resultados anteriores que el Ejemplo 5 muestra alta capacidad de restauración en su conjunto ya que el cartílago restaurado es casi cercano a un tejido normal en términos del estado de la superficie y la integridad histológica a un tejido normal aunque es equivalente al Ejemplo Comparativo 5 en términos de tinción de la matriz y grosor del cartílago restaurado.

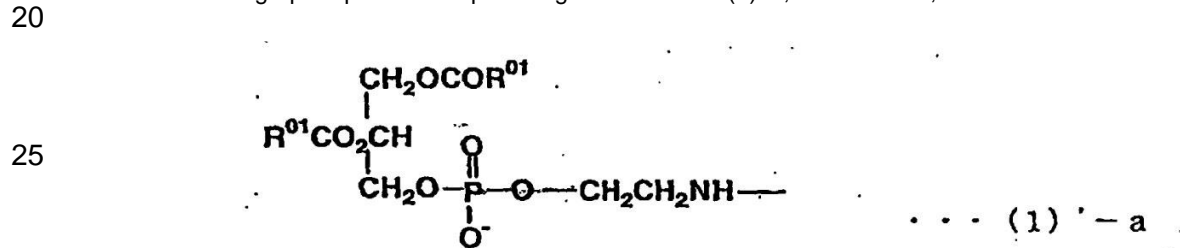
Se ha descubierto de este modo que el compuesto de ácido hialurónico obtenido de ácido hialurónico y fosfatidil etanolamina dioleoil es superior al Ejemplo comparativo (atelocolágeno) como un material para tratar el cartílago.

REIVINDICACIONES

1. Un hidrogel de un compuesto de ácido hialurónico representado por la fórmula siguiente (1):



donde R es un grupo representado por la siguiente fórmula (1)-a, -OH o -ONa,

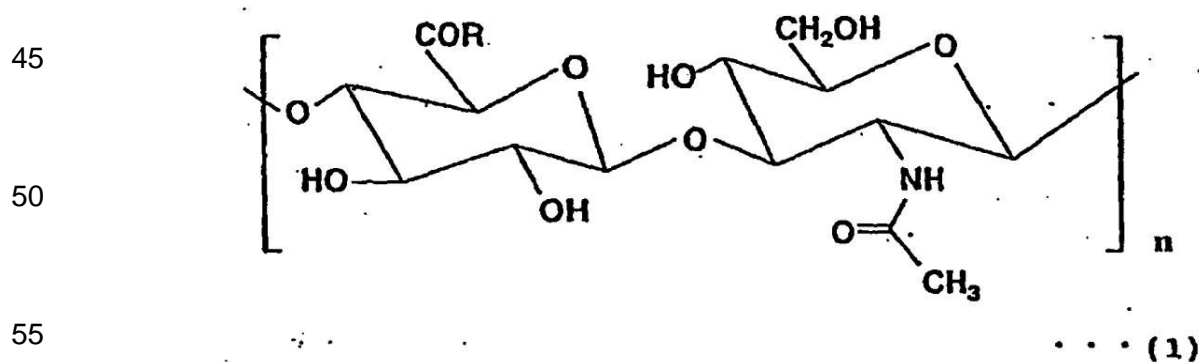


donde R⁰¹ es un grupo alquenoilo que tiene de 10 a 28 átomos de carbono, y n es un entero de 50 a 50.000, con la condición de que de un 1 a un 100% de R⁰ sea el grupo representado por la fórmula anterior (1) -a.

35 2. El hidrogel de acuerdo con la reivindicación 1, en donde n es de 300 a 30.000.

3. El hidrogel de acuerdo con la reivindicación 1, en donde dos R⁰¹CO-'s en la fórmula (1)-a son ambos grupos oleoilos.

40 4. Un material para tratar articulaciones que comprende un hidrogel de un compuesto de ácido hialurónico representado por la fórmula siguiente (1):

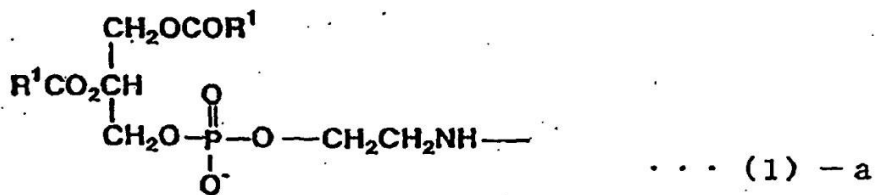


donde R es un grupo representado por la fórmula siguiente (1)-a, -OH o -ONa,

60

65

5



10

donde R¹ es un grupo alquilo o grupo alquenilo que tiene de 10 a 28 átomos de carbono, y n es un entero de 50 a 50.000, con la condición de que de un 1 a un 100% de R sea el grupo representado por la fórmula anterior.

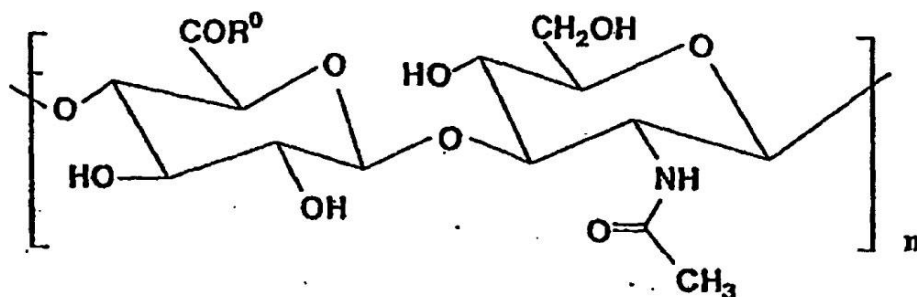
15

5. El material para tratar articulaciones de acuerdo con la reivindicación 4 que tiene capacidad de restaurar el cartílago.

20

6. Un compuesto de ácido hialurónico para usar en el tratamiento de una articulación, dicho compuesto de ácido hialurónico estando representado por la fórmula siguiente (1)':

25

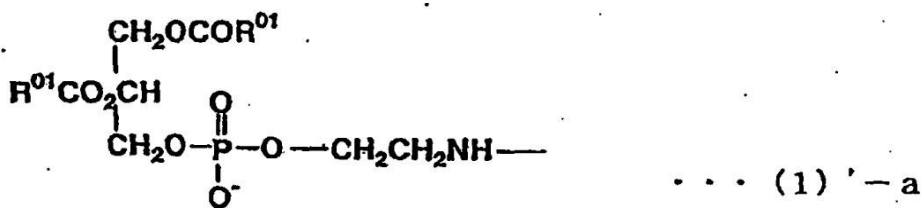


30

35

donde R⁰ es un grupo representado por la fórmula siguiente (1)'-a, -OH o -ONa,

40



45

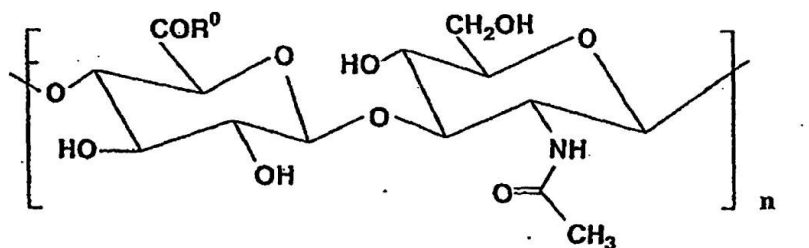
50

donde R⁰¹ es un grupo alquenilo que tiene de 10 a 28 átomos de carbono, y n es un entero de 50 a 50.000, con la condición de que de un 1 a un 100% de R⁰ sea un grupo representado por la fórmula anterior (1)'-a.

55

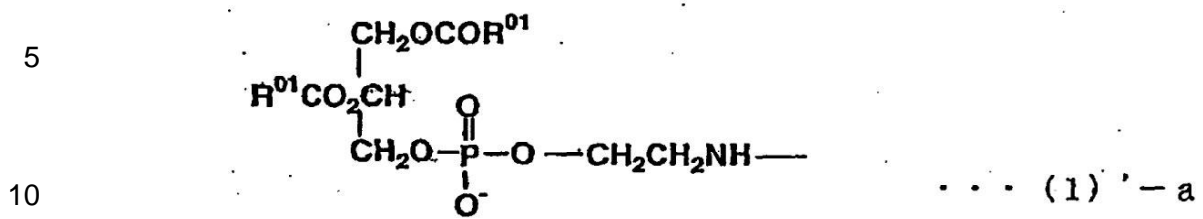
7. El uso de un compuesto de ácido hialurónico para la fabricación de un medicamento para tratar una articulación, dicho compuesto de ácido hialurónico estando representado por la fórmula siguiente (1)':

60



65

donde R⁰ es un grupo representado por la fórmula siguiente (1)'-a, -OH o -ONa,



donde R⁰¹ es un grupo alquenoilo que tiene de 10 a 28 átomos de carbono, y n es un entero de 50 a 50.000, con la condición de que de un 1 a un 100% de R⁰ sea el grupo representado por la fórmula anterior (1)'-a.

Fig. 1

Evaluación histológica de la articulación de rodilla de conejo 8 semanas después de la operación

