

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 972 523**

51 Int. Cl.:

**A61L 27/20** (2006.01)

**A61K 47/02** (2006.01)

**A61L 26/00** (2006.01)

**A61P 19/00** (2006.01)

**A61K 31/734** (2006.01)

12

## TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **27.01.2017** **PCT/JP2017/002925**

87 Fecha y número de publicación internacional: **28.09.2017** **WO17163603**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **27.01.2017** **E 17769650 (7)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **29.11.2023** **EP 3434291**

54 Título: **Composición para el tratamiento del disco intervertebral**

30 Prioridad:

**23.03.2016 JP 2016058396**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:  
**13.06.2024**

73 Titular/es:

**NATIONAL UNIVERSITY CORPORATION  
HOKKAIDO UNIVERSITY (50.0%)  
Kita 8-ryo Nishi 5-chome Kita-ku, Sapporo-shi,  
Hokkaido 060-0808, JP y  
MOCHIDA PHARMACEUTICAL CO., LTD. (50.0%)**

72 Inventor/es:

**SUDO, HIDEKI;  
TSUJIMOTO, TAKERU;  
IWASAKI, NORIMASA;  
SHIMIZU, SATOSHI y  
ISAJI, MITSUKO**

74 Agente/Representante:

**GONZÁLEZ PECES, Gustavo Adolfo**

ES 2 972 523 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 el tratamiento del disco intervertebral

## 5 CAMPO TÉCNICO

La presente invención se refiere a una composición para su uso en el relleno de un núcleo pulposos de un disco intervertebral.

## 10 ANTECEDENTES DE LA TÉCNICA

Una columna vertebral es un esqueleto columnar que tiene una serie de vértebras, que proporciona soporte para el tronco y la cabeza. Las vértebras están unidas entre sí por un disco intervertebral. Un disco intervertebral es un tejido avascular en forma de disco estructurado para tener un anillo fibroso que rodea un núcleo pulposos en el centro y también provisto de placas terminales por encima y por debajo. El núcleo pulposos del disco intervertebral es una estructura gelatinosa de gran elasticidad y alto contenido en agua, formada por células del núcleo pulposos y una matriz extracelular, que sirve de amortiguador para absorber la fuerza ejercida entre los cuerpos vertebrales. El anillo fibroso está formado por láminas de fibrocartilago y capas de colágeno que lo rodean, y limita el movimiento de rotación entre los cuerpos vertebrales. Las placas terminales son tejido cartilaginoso hialino que conecta fuertemente el disco intervertebral con el cuerpo vertebral.

El núcleo pulposos en el centro del disco intervertebral tiene una composición distintiva en comparación con el anillo fibroso, las placas terminales y otros tejidos cartilaginosos. En concreto, la matriz extracelular del núcleo pulposos se compone principalmente de agua (70-90%; disminuye con la edad), colágeno de tipo II (20% del peso seco) y proteoglicanos (50% del peso seco), y se caracteriza por tener una mayor proporción de proteoglicanos que de colágeno en comparación con otros tejidos cartilaginosos tal como las placas terminales y el cartilago articular (documento no patentado 1). Mientras tanto, la matriz extracelular de otros tejidos cartilaginosos, tal como el cartilago articular, tiene una proporción más elevada de colágeno que de proteoglicanos. La función del disco intervertebral como amortiguador debe mucho a su rico contenido en agua. Un contenido tan rico en agua se mantiene principalmente porque los glicosaminoglicanos unidos a las proteínas del núcleo de los proteoglicanos están cargados negativamente y, por tanto, atraen el agua. También se divulga que la estructura y el tamaño de los proteoglicanos existentes en el disco intervertebral difieren de los proteoglicanos existentes en el cartilago articular, y que estas diferencias eran particularmente significativas para los proteoglicanos del núcleo pulposos (Documento no patente 2).

El núcleo pulposos, el anillo fibroso y las placas terminales de un disco intervertebral tienen estructuras y funciones diferentes, y son mantenidos respectivamente por grupos celulares con fenotipos distintos. Las células que existen en el núcleo pulposos son redondas y producen una matriz rica en proteoglicanos. Las células existentes en el anillo fibroso están incrustadas en una matriz de fibras de colágeno. Estas células del disco intervertebral tienen fenotipos distintos y también se ha informado recientemente de que son fenotípicamente diferentes de los condrocitos articulares (Documento no patente 1).

Un disco intervertebral puede degenerarse o lesionarse debido al envejecimiento, traumatismos, enfermedades o similares. La degeneración del disco intervertebral se refiere a un estado donde el número de células, el contenido de agua, la matriz extracelular (colágeno de tipo II, agregano, etc.) y similares disminuyen en el disco intervertebral, lo que puede progresar de tal manera que el disco intervertebral ya no pueda realizar la función de amortiguador. La degeneración y la lesión del disco intervertebral son específicamente la hernia discal, la discopatía, la espondilolistesis degenerativa, la discitis piógena, la espondilosis deformante, la estenosis del canal espinal, las lesiones del disco intervertebral debidas a traumatismos y similares. Por ejemplo, en un caso de hernia discal, la deformación o fisura del anillo fibroso que envuelve el núcleo pulposos constituye una hernia que sobresale fuera del disco intervertebral, donde el núcleo pulposos que sobresale ejerce presión sobre el nervio espinal, causando dolor, pérdida de sensibilidad o similares.

La nucleotomía (resección) intervertebral es uno de los tratamientos para la hernia discal, cuya eficacia se ha confirmado hasta cierto punto. Sin embargo, se sabe que una nucleotomía intervertebral (resección) a veces termina en el progreso de los cambios degenerativos del disco intervertebral, ya que el sitio quirúrgico no se trata después de la nucleotomía intervertebral. Cuando se extirpa una parte del núcleo pulposos mediante nucleotomía intervertebral, se forma una cavidad en el lugar del núcleo pulposos (en lo sucesivo, también denominada "parte defectuosa"). Dado que el núcleo pulposos tiene poca capacidad de autorreparación y regeneración, es probable que la cavidad del núcleo pulposos también sea físicamente débil. Además, células similares a fibroblastos pueden acumularse en la parte de la cavidad para formar un tejido con características dinámicas diferentes de las intrínsecas al núcleo pulposos original. Por lo tanto, la tasa de recurrencia de la hernia después de la nucleotomía intervertebral es alta. Se dice que la tasa de recurrencia en los 5 años siguientes a la nucleotomía intervertebral es de aproximadamente el 4-15%, pero los datos recientes a largo plazo muestran que más de la mitad de los casos se asocian a recurrencia después de 10 años. Mientras que la recurrencia de la hernia requiere otra intervención quirúrgica, los nervios raquídeos están incrustados en el tejido cicatricial creado tras la primera intervención y, por tanto, sería difícil averiguar la ubicación del nervio espinal. Aunque pueda confirmarse la localización del nervio espinal, la gruesa y dura cicatriz dificultaría enormemente la separación del nervio espinal del tejido circundante. Se requeriría una técnica extremadamente difícil para otra cirugía. Por consiguiente, es necesario establecer un procedimiento quirúrgico que no se asocie con la reaparición de hernia y cicatrices tras la nucleotomía intervertebral.

Como un intento de tratar una enfermedad de disco intervertebral, por ejemplo, se ha propuesto un procedimiento terapéutico para introducir un material electrolítico polimérico (material polielectrolítico) en un espacio de un disco intervertebral sin retirar el núcleo pulposo o el anillo fibroso, donde el alginato se incluye como uno de los muchos ejemplos específicos de los electrolitos poliméricos (Documento de patente 1). Además, se ha propuesto un procedimiento para mejorar la función de un disco intervertebral que comprende la inyección de un material protector del cartílago, como el glicosaminoglicano, en un lugar necesitado, en donde se incluye un derivado anfipático del alginato de sodio como uno de los muchos ejemplos específicos del material protector del cartílago (Documento de patente 2). También se divulga un dispositivo para inyectar un antiácido en un disco intervertebral (Documento de patente 3). Además de la inyección de un antiácido, puede utilizarse opcionalmente para inyectar un relleno de disco intervertebral, donde el alginato reticulado con calcio o bario se incluye como uno de los muchos ejemplos específicos de relleno (Documento de patente 3). En estos documentos, sin embargo, el alginato se incluye simplemente como uno de los muchos ejemplos específicos, y no se describe ningún procedimiento o ejemplo específico para utilizar el alginato.

Además, se han considerado hidrogeles de alginato o similares como material para rellenar el núcleo pulposo. En el uso de hidrogeles de alginato o similares como material de relleno del núcleo pulposo, su resistencia mecánica ha sido un problema. Por lo tanto, se ha recomendado un material que pueda mantener su forma durante cierto tiempo cuando se utiliza *in vivo* y sería bueno que tuviera una dureza elevada (Documentos de no patente 3-9).

Así, se ha propuesto el uso de un alginato para la regeneración de un cartílago de, por ejemplo, una articulación, una pared torácica, un disco intervertebral o un menisco (documentos de patente 4-5).

## DOCUMENTOS DEL ESTADO DE LA TÉCNICA

### Documentos de patentes

Documento de patente 1: Memoria descriptiva de Publicación de Solicitud de Patente de EE.UU. No. 2007/0150060  
Documento de patente 2: Memoria descriptiva de Publicación de Solicitud de Patente de EE.UU. No. 2003/0069639  
Documento de patente 3: Memoria descriptiva de Publicación de Solicitud de Patente de EE.UU. No. 2009/0082719  
Documento de patente 4: Publicación de Patente Internacional No. 2008/102855  
Documento de patente 5: Publicación de Patente Internacional No. 2013/027854

### Documentos de no patente

Documento de no patente 1: Journal of Anatomy (2012) 221, p. 480-496  
Documento de no patente 2: Journal of Orthopaedic Research (1989) 7, p.146-151  
Documento de no patente 3: Cloyd et al, Eur Spine J (2007) 16, p.1892-1898 divulga la formación y las pruebas mecánicas de geles de ácido algínico.  
Documento de no patente 4: Osteoarthritis and Cartilage (2009) 17, p. 1377-1384  
Documento de no patente 5: Journal of the Mechanical Behavior of Biomedical Materials (2014) 29, p.56-67  
Documento de no patente 6: Journal of the Mechanical Behavior of Biomedical Materials (2011) 4, p.1196-1205  
Documento de no patente 7: Acta Biomaterialia (2014) 10, p.1646-1662  
Documento de no patente 8: Spine J (2013) 13 (3), p.243-262  
Documento de no patente 9: Materials Science and Engineering 63 (2016) p.198-210

## SUMARIO DE LA INVENCION

### Problemas que resuelve la invención

En las circunstancias descritas anteriormente, el objetivo de la presente invención es proporcionar una composición para rellenar un núcleo pulposo de un disco intervertebral, que sea capaz de promover la regeneración del núcleo pulposo. Además, el objetivo es proporcionar una composición para el relleno del núcleo pulposo que permita una operación de relleno relativamente fácil con un bajo riesgo de complicaciones como la compresión en el nervio espinal.

### Medios para resolver los problemas

Los presentes inventores han estudiado la posibilidad de rellenar el núcleo pulposo con un material biocompatible, como procedimiento terapéutico para la degeneración y lesión del disco intervertebral. Hasta ahora, el uso de hidrogeles de un alginato o similar como material para rellenar el núcleo pulposo se ha examinado particularmente en este campo terapéutico con una preocupación en la resistencia mecánica de los hidrogeles y se ha recomendado para mantener su forma durante un cierto período de tiempo después de su uso *in vivo*. Por el contrario, los presentes inventores descubrieron que la regeneración de un núcleo pulposo de un disco intervertebral puede promoverse inyectando una composición que contiene un alginato de sodio de baja endotoxina en estado sol en un lugar del núcleo pulposo y poniendo

en contacto un agente reticulante con una entrada de relleno de la composición en la superficie del disco intervertebral con el fin de curar una parte de la composición para evitar fugas, suprimiendo así la degeneración del núcleo pulposo del disco intervertebral y aumentando la proporción de células positivas de colágeno de tipo II favorables para la regeneración del núcleo pulposo. Además, descubrieron que también se puede suprimir la degeneración de todo el tejido del disco intervertebral, incluido el anillo fibroso. Los presentes inventores llevaron a cabo otros estudios basados en tales hallazgos, logrando así la presente invención.

Así pues, la presente invención es la siguiente.

- [1] Una composición para su uso en el relleno de un núcleo pulposo de un disco intervertebral que comprende una sal metálica monovalente de ácido alginico de baja endotoxina, que debe aplicarse a un sitio del núcleo pulposo de un sujeto, que se cura poniendo en contacto un agente reticulante con al menos una parte de la superficie de la composición aplicada, y que tiene fluidez cuando se aplica al sitio del núcleo pulposo.
- [2] La composición para su uso en el núcleo pulposo de un disco intervertebral de acuerdo con [1], en donde la composición se aplica al núcleo pulposo a través de una entrada de relleno de composición en la superficie del disco intervertebral, y se cura poniendo en contacto un agente reticulante con la entrada de relleno de composición en la superficie del disco intervertebral.
- [3] La composición para su uso en el relleno de un núcleo pulposo de un disco intervertebral de acuerdo con uno de los anteriores [1]-[2], en donde la composición se cura parcialmente después de aplicarse al núcleo pulposo.
- [4] La composición para su uso en el relleno de un núcleo pulposo de un disco intervertebral de acuerdo con uno cualquiera de los anteriores [1]-[3], en donde el curado parcial de la composición en el lugar del núcleo pulposo puede determinarse por comparación con un procedimiento in vitro, en donde al menos el 50% del volumen de la composición en un tubo de ensayo de 6 mm de diámetro no está gelificado cuando se puede succionar con una jeringa con una aguja de 21G después de llenar el tubo de ensayo con 500 µl de un alginato de sodio de baja endotoxina y un agente reticulante empleando el mismo procedimiento y proporción para utilizar el agente reticulante que para el llenado en el sitio del núcleo pulposo, y dejándolo reposar durante una hora.
- [5] La composición para su uso en el relleno de un núcleo pulposo de un disco intervertebral de acuerdo con uno cualquiera de los anteriores [1]-[4], en donde la composición se va a aplicar al sitio del núcleo pulposo aplicando la composición a un sitio defectuoso del núcleo pulposo formado mediante la extirpación de al menos una parte del núcleo pulposo.
- [6] La composición para su uso en el relleno de un núcleo pulposo de un disco intervertebral de acuerdo con uno cualquiera de los anteriores [1]-[5], en donde la viscosidad aparente de la composición que tiene fluidez es de 500 mPa s a 10.000 mPa s medida en una solución al 2% con un viscosímetro de placa cónica en condiciones de 20 °C, la velocidad de rotación es de 0,5 rpm, y el tiempo de lectura es de 2,5 min de medición para obtener como viscosidad aparente el promedio de los valores tomados durante el período comprendido entre 0,5 y 2,5 min después del inicio de la medición.
- [7] La composición para su uso en el relleno de un núcleo pulposo de un disco intervertebral de acuerdo con uno cualquiera de los anteriores [1]-[6], en donde (i) el peso molecular promedio en peso (peso molecular absoluto) de la sal metálica monovalente de ácido alginico de baja endotoxina es 80.000 o más, medido por un procedimiento GPC-MALS; y/o (ii) la concentración de la sal metálica monovalente de ácido alginico de baja endotoxina es de 0,5 p/v% a 5 p/v%.
- [8] La composición para su uso en el relleno de un núcleo pulposo de un disco intervertebral de acuerdo con uno cualquiera de [1]-[7] anteriores, en donde (i) la composición no contiene el agente reticulante en una cantidad que permita el curado de la composición antes de la aplicación en el lugar del núcleo pulposo del sujeto; y/o (ii) en donde la composición que tiene fluidez tiene una fluidez que permite la inyección con una aguja 21G después de dejar reposar la composición a 20 °C durante una hora.
- [9] La composición para su uso en el relleno de un núcleo pulposo de un disco intervertebral de acuerdo con uno cualquiera de los anteriores [1]-[8], en donde la composición no contiene una célula.
- [10] La composición para su uso en el relleno de un núcleo pulposo de un disco intervertebral de acuerdo con uno cualquiera de los anteriores [1]-[9], en donde el agente reticulante es un compuesto iónico metálico divalente o de mayor valencia.
- [11] La composición para su uso en el relleno de un núcleo pulposo de un disco intervertebral de acuerdo con uno cualquiera de los anteriores [1]-[10], en donde la composición se aplica en combinación con al menos una seleccionada entre células y un factor para promover el crecimiento de las células; preferentemente las células se seleccionan de células del núcleo pulposo, células madre, células estromales, células madre mesenquimales, células estromales de médula ósea, células ES no humanas y células iPS, y el factor para promover el crecimiento de las células se selecciona de BMP, FGF, VEGF, HGF, TGF-β, IGF-1, PDGF, proteína morfogenética derivada del cartilago (CDMP), CSF, EPO, IL, plasma rico en plaquetas (PRP), SOX e IF.
- [12] La composición para su uso en el relleno de un núcleo pulposo de un disco intervertebral de acuerdo con uno cualquiera de [1] a [11] anteriores, en donde la composición se utiliza para tratar, prevenir o suprimir la recurrencia de una degeneración del disco intervertebral y/o una lesión del disco intervertebral, preferentemente, la degeneración del disco intervertebral y/o la lesión del disco intervertebral es al menos una de las seleccionadas de hernia discal, discopatía, espondilolistesis degenerativa, discitis piógena, espondilosis deformante, estenosis del canal espinal y lesión del disco intervertebral.
- [13] La composición para su uso en el relleno de un núcleo pulposo de un disco intervertebral de acuerdo con uno cualquiera de los anteriores [1]-[12], en donde la composición está en estado seco o en estado de solución

antes de aplicarse al sitio del núcleo pulposo, preferentemente la sal metálica monovalente de ácido algínico de baja endotoxina en estado seco es un liofilizado.

[14] Un kit para rellenar un núcleo pulposo de un disco intervertebral, que comprende al menos la composición de acuerdo con uno cualquier de [1] a [13] anteriores y un agente reticulante.

[15] Una sal metálica monovalente de baja endotoxina de ácido algínico para su uso en el relleno de un núcleo pulposo de un disco intervertebral, en donde la sal metálica monovalente de baja endotoxina de ácido algínico se aplica a un núcleo pulposo a través de una entrada de relleno de la composición en la superficie del disco intervertebral y se cura poniendo en contacto un agente reticulante con la entrada de relleno en la superficie del disco intervertebral.

## EFEECTO DE LA INVENCION

La presente invención proporciona una composición para su uso en el relleno de un núcleo pulposo de un disco intervertebral, que es capaz de promover la regeneración del núcleo pulposo. La composición para su uso en el relleno de un núcleo pulposo de un disco intervertebral de la presente invención es capaz de suprimir el cambio degenerativo no sólo en el núcleo pulposo del disco intervertebral, sino también en todo el tejido del disco intervertebral, incluyendo el anillo fibroso. Además, la composición para su uso en el relleno de un núcleo pulposo de un disco intervertebral de la presente invención tiene un efecto de aumento de la proporción de las células similares al cartílago hialino positivas al colágeno de tipo II en el núcleo pulposo.

En un aspecto preferente de la presente invención, una composición para su uso en el relleno de un núcleo pulposo de un disco intervertebral de la presente invención puede usarse como material para rellenar el núcleo pulposo para tratar, prevenir o suprimir la recurrencia de una enfermedad relacionada con una degeneración del disco intervertebral tal como una hernia discal, y una lesión del disco intervertebral debida a un traumatismo.

Además, una composición para su uso en el relleno de un núcleo pulposo de un disco intervertebral de la presente invención es capaz de inyectarse en estado sólido en un sitio del núcleo pulposo mediante el uso de una jeringa y también permite el llenado no sólo bajo visión directa, sino también después de una nucleotomía transdérmica (incisión de aproximadamente 5 mm), bajo un microscopio (incisión de aproximadamente 3-4 cm) y bajo un endoscopio (incisión de aproximadamente 1-2 cm). Por lo tanto, se puede reducir la carga sobre los pacientes y la manipulación puede ser relativamente fácil.

Además, un material convencional para rellenar el núcleo pulposo que esté totalmente gelificado tiene el riesgo de comprimir y dañar el nervio espinal si por casualidad sobresale en el canal espinal. Por otra parte, una composición para su uso en el relleno de un núcleo pulposo de un disco intervertebral de la presente invención tiene poca preocupación acerca de tales complicaciones y por lo tanto es seguro, ya que se gelifica sólo en la superficie.

Una composición para su uso en el relleno de un núcleo pulposo de un disco intervertebral de la presente invención es capaz de prevenir la recurrencia de la hernia y la cicatrización después de la nucleotomía intervertebral (resección). Además, la aplicación de la composición para su uso en el relleno de un núcleo pulposo de un disco intervertebral de la presente invención a un núcleo pulposo de un disco intervertebral que tenga una degeneración de disco intervertebral y/o una lesión de disco intervertebral para el tratamiento reduciría la carga sobre un disco intervertebral adyacente al disco intervertebral tratado, previniendo y/o aliviando así la degeneración del disco intervertebral adyacente.

La composición para su uso en el relleno de un núcleo pulposo de un disco intervertebral de la presente invención satisface una o más de las ventajas descritas anteriormente.

## BREVE DESCRIPCION DE LOS DIBUJOS

[Figura 1] La Figura 1 muestra los porcentajes de células viables a las 6 y 48 h del inicio de la inanición de suero. Grupo A: alginato sódico de baja endotoxina; y Grupo B: alginato sódico de calidad alimentaria.

[Figura 2] La Figura 2 muestra los porcentajes de células apoptóticas a las 6 y 48 h del inicio de la inanición de suero. Grupo A: alginato sódico de baja endotoxina; y Grupo B: alginato sódico de calidad alimentaria.

[Figura 3] La Figura 3 es un gráfico que muestra los resultados de la evaluación de los tejidos del disco intervertebral de acuerdo con la clasificación de Pfirrmann a las cuatro semanas de la intervención. Un grupo de control normal, un grupo de sólo succión y grupos de tratamiento (Grupos A-1 y A-2).

[Figura 4] La figura 4 es un gráfico que muestra los resultados de la evaluación de los tejidos del disco intervertebral de acuerdo con el índice de IRM a las cuatro semanas de la intervención. Un grupo de sólo aspiración y grupos de tratamiento (Grupos A-1 y A-2).

[Figura 5] La Figura 5 es un gráfico que muestra los resultados de la evaluación histológica de la gravedad de la degeneración del disco intervertebral a las cuatro semanas de la intervención quirúrgica. Un grupo de control normal, un grupo de sólo succión y grupos de tratamiento (Grupos A-1 y A-2).

[Figura 6] La Figura 6(A) muestra imágenes de especímenes de tejido de disco intervertebral teñidas a las cuatro semanas de la intervención. Un grupo de control normal, un grupo de sólo succión y un grupo de tratamiento (Grupo A-2).

La Figura 6(B) muestra imágenes de especímenes de tejido de disco intervertebral teñidas a las doce semanas de la intervención. Un grupo de control normal, un grupo de sólo succión y un grupo de tratamiento (Grupo A-2). [Figura 7] La Figura 7 es un gráfico que muestra los porcentajes de células positivas al anticuerpo contra el colágeno de tipo II con respecto al número de células en la sección de tejido del disco intervertebral a las cuatro y doce semanas después de la cirugía. Un grupo de control normal, un grupo de sólo succión y un grupo de tratamiento (Grupo A-2). [Figura 8] La Figura 8 es un gráfico que muestra los resultados de la evaluación de acuerdo con la clasificación de Boos modificada a las cuatro semanas de la cirugía de la oveja. Un grupo de control normal, un grupo de nucleotomía y un grupo de tratamiento. \*P<0,05, \*\*P<0,01. [Figura 9] La Figura 9 es un gráfico que muestra los resultados de la evaluación de acuerdo con el índice de altura del disco a las cuatro semanas de la cirugía de la oveja. Un grupo de control normal, un grupo de nucleotomía y un grupo de tratamiento. \*P<0,05. [Figura 10] La Figura 10 es un gráfico que muestra los porcentajes de células positivas al anticuerpo contra el colágeno de tipo II con respecto a las células de las secciones de tejido del disco intervertebral a las cuatro semanas de la cirugía de la oveja. Un grupo de control normal, un grupo de nucleotomía y un grupo de tratamiento. \*P<0,05. [Figura 11] La Figura 11 muestra las proporciones de glicosaminoglicano sulfatado (GAG) e hidroxiprolina (HYP) de los núcleos pulposos de los discos intervertebrales a las cuatro semanas de la intervención quirúrgica. Un grupo de nucleotomía, un grupo de tratamiento, un grupo de control normal y un cartílago articular.

## MODOS DE REALIZACIÓN DE LA INVENCION

A continuación se describirá en detalle la presente invención. La invención se define en las reivindicaciones.

### 1. Composición de la presente invención

La presente invención se refiere a una composición para su uso en el relleno de un núcleo pulposos de un disco intervertebral. La composición de la presente invención es una composición para su uso en el relleno de un núcleo pulposos de un disco intervertebral que comprende una sal metálica monovalente de baja endotoxina de ácido algínico, que se utiliza mediante la aplicación a un sitio del núcleo pulposos de un sujeto y parcialmente curado después de la aplicación y que tiene fluidez cuando se aplica al sitio del núcleo pulposos (en el presente documento, a veces referido como una "composición de la presente invención").

"Baja endotoxina" y "una sal metálica monovalente del ácido algínico" son como se describen a continuación.

Un "disco intervertebral" es un tejido columnar situado entre las vértebras que forman la columna vertebral. Un disco intervertebral es un tejido avascular en forma de disco estructurado para tener un anillo fibroso que rodea un núcleo pulposos en el centro y también provisto de placas terminales por encima y por debajo.

El "núcleo pulposos" es un tejido gelatinoso situado en el centro del disco intervertebral, que contiene principalmente células del núcleo pulposos, una matriz extracelular compuesta principalmente de proteoglicano y colágeno de tipo II, y agua. Se considera que el núcleo pulposos tiene poca capacidad de autorreparación/regeneración.

"Relleno de núcleo pulposos" se refiere al relleno de una parte degenerada, una parte encogida o una parte extirpada de un núcleo pulposos degenerado, encogido o extirpado como consecuencia del envejecimiento, un traumatismo, una infección, una operación quirúrgica al respecto (por ejemplo, una nucleotomía (resección) intervertebral). En el presente documento, el término "reposición del núcleo pulposos" se utiliza en el mismo sentido que "relleno del núcleo pulposos", y una "composición para rellenar el núcleo pulposos" de la presente invención es sinónimo de una "composición para reponer el núcleo pulposos".

Un "sitio del núcleo pulposos" se refiere a un sitio donde existe un núcleo pulposos, un sitio degenerado o encogido de un núcleo pulposos, o una parte defectuosa de un núcleo pulposos formada por la extirpación de al menos una parte del núcleo pulposos, y también incluye una parte periférica del sitio donde existe el núcleo pulposos.

Por "sujeto" se entiende un ser humano o un ser vivo distinto de un ser humano, por ejemplo, un ave o un mamífero no humano (por ejemplo, bovino, mono, gato, ratón, rata, cobaya, hámster, cerdo, perro, conejo, oveja y caballo).

"Aplicación" significa llenar un sitio del núcleo pulposos de un disco intervertebral con una composición de la presente invención en una cantidad suficiente para incrustar una parte degenerada, una parte encogida, una parte extirpada o una parte defectuosa del sitio del núcleo pulposos.

La expresión "parcialmente curado" se refiere a lo descrito a continuación.

La frase "contener una sal metálica monovalente de baja endotoxina de ácido algínico" significa que la composición de la presente invención contiene una sal metálica monovalente de baja endotoxina de ácido algínico en una cantidad suficiente para regenerar el sitio del núcleo pulposos aplicado.

La frase "tener fluidez" significa lo que se describe a continuación.

Una "degeneración del disco intervertebral y/o lesión del disco intervertebral", y un "tratamiento, prevención o supresión de la recurrencia" significan lo que se describe a continuación.

La composición de la presente invención puede proporcionarse en estado de solución utilizando un disolvente, o en estado seco como liofilizado (en particular, polvo liofilizado). Si la composición de la presente invención se suministra en estado seco, debe utilizarse en un estado con fluidez, tal como un estado de solución, utilizando un disolvente en el momento de la aplicación. El disolvente no está particularmente limitado siempre que pueda aplicarse a un cuerpo vivo, y puede ser, por ejemplo, agua inyectable, agua purificada, agua destilada, agua de intercambio iónico (o agua desionizada), agua Milli-Q, solución salina fisiológica y solución salina fisiológica tamponada con fosfato (PBS). Preferentemente, se trata de agua inyectable, agua destilada o solución salina fisiológica que puede utilizarse para tratar a un ser humano y a un animal.

## 2. Sal metálica monovalente del ácido algínico

La "sal metálica monovalente del ácido algínico" es una sal soluble en agua formada por intercambio iónico entre un átomo de hidrógeno del ácido carboxílico en la posición 6 del ácido algínico y un ion metálico monovalente tal como  $\text{Na}^+$  o  $\text{K}^+$ . Aunque entre los ejemplos específicos de sales metálicas monovalentes del ácido algínico se incluyen el alginato de sodio y el alginato de potasio, es particularmente preferible el alginato de sodio que se puede adquirir como producto comercial. Una solución de una sal metálica monovalente de ácido algínico forma un gel cuando se mezcla con un agente reticulante.

El "ácido algínico" utilizado en la presente invención es un polisacárido biodegradable de alto peso molecular que es un polímero obtenido por polimerización lineal de dos tipos de ácidos urónicos en forma de ácido D-manurónico (M) y ácido L-glurónico (G). Más concretamente, el ácido algínico es un copolímero en bloque en donde se enlazan arbitrariamente una fracción homopolímera de ácido D-manurónico (fracción MM), una fracción homopolímera de ácido L-glurónico (fracción GG) y una fracción en donde el ácido D-manurónico y el ácido L-glurónico están dispuestos aleatoriamente (fracción MG). La proporción compuesta entre el ácido D-manurónico y el ácido L-glurónico del ácido algínico (proporción M/G) varía principalmente de acuerdo con el tipo de alga u otro organismo que sirva como origen de la misma, se ve afectada por el hábitat y la estación de dicho organismo, y se extiende en un amplio intervalo que va desde un tipo G alto que tiene una proporción M/G de aproximadamente 0,4 hasta un tipo M alto que tiene una proporción M/G de aproximadamente 5.

Aunque una sal metálica monovalente de ácido algínico es un polisacárido de alto peso molecular y es difícil determinar con precisión el peso molecular del mismo, tiene un peso molecular medio generalmente en un intervalo de 10.000-10.000.000, preferentemente 20.000-8.000.000 y más preferentemente 50.000-5.000.000, ya que un peso molecular demasiado bajo da lugar a una viscosidad baja, por lo que la adhesión al tejido que rodea el lugar de aplicación puede debilitarse, y un peso molecular demasiado alto dificulta la producción, disminuye la solubilidad, dificulta la manipulación debido a una viscosidad demasiado alta en estado de solución, dificulta el mantenimiento de las propiedades físicas durante la conservación a largo plazo. En el presente documento, los intervalos numéricos expresados con "-to" representan cada uno un intervalo que incluye los valores numéricos que preceden y siguen a "-to" como valores mínimo y máximo, respectivamente.

Mientras tanto, se sabe que se producen diferencias en los valores de acuerdo con el procedimiento de medición en la medición de los pesos moleculares de sustancias de alto peso molecular derivadas de un origen natural. Por ejemplo, un peso molecular promedio en peso medido por cromatografía de permeación en gel (GPC) o cromatografía de filtración en gel (que también se denominan colectivamente cromatografía de exclusión por tamaño) es preferentemente 100.000 o más y más preferentemente 500.000 o más, mientras que preferentemente 5.000.000 o menos y más preferentemente 3.000.000 o menos, de acuerdo con los efectos mostrados en los ejemplos de la presente invención. El intervalo preferible es de 100.000 a 5.000.000, y más preferentemente de 500.000 a 3.500.000.

Además, puede medirse un peso molecular promedio ponderado absoluto, por ejemplo, mediante un procedimiento GPC-MALS que emplea una combinación de cromatografía de permeación en gel (GPC) y un detector de dispersión de luz multiángulo (Dispersión de Luz Multiángulo: MALS). El peso molecular promedio en peso (peso molecular absoluto) medido por el procedimiento GPC-MALS es preferentemente 10.000 o más, más preferentemente 80.000 o más y aún más preferentemente 90.000 o más, mientras que preferentemente 1.000.000 o menos, más preferentemente 800.000 o menos, aún más preferentemente 700.000 o menos y particularmente preferentemente 500.000 o menos, de acuerdo con los efectos mostrados en los ejemplos de la presente invención. El intervalo preferible es de 10.000 a 1.000.000, más preferentemente de 80.000 a 800.000, aún más preferentemente de 90.000 a 700.000, y particularmente preferentemente de 90.000 a 500.000.

Cuando se calcula el peso molecular de un polisacárido de alto peso molecular mediante el procedimiento descrito anteriormente, normalmente existe la posibilidad de un error de medición del 10 al 20%. Por ejemplo, un peso molecular de 400.000 puede fluctuar dentro del intervalo de 320.000 a 480.000, un peso molecular de 500.000 puede fluctuar dentro del intervalo de 400.000 a 600.000, y un peso molecular de 1.000.000 puede fluctuar dentro del intervalo de 800.000 a 1.200.000.

El peso molecular de una sal metálica monovalente del ácido algínico puede medirse de acuerdo con un procedimiento común. Las condiciones típicas para la medición del peso molecular mediante cromatografía de permeación en gel son las descritas en los ejemplos del presente documento. Por ejemplo, se puede usar GMPW-XL × 2 + G2500PW-XI, (7,8 mm D.I. × 300 mm) como columnas, se puede usar una solución acuosa de nitrato de sodio 200 mM como eluyente y se puede utilizar pululano como patrón de peso molecular.

Las condiciones típicas para la medición del peso molecular mediante GPC-MALS son las descritas en los ejemplos del presente documento. Por ejemplo, pueden utilizarse como detectores un detector RI y un detector de dispersión de luz (MALS).

Aunque una sal metálica monovalente de ácido algínico tiene un gran peso molecular y una viscosidad relativamente alta cuando se extrae originalmente de algas pardas, el peso molecular se reduce y la viscosidad disminuye en el transcurso del secado térmico y la purificación. Mediante la gestión de las condiciones tales como la temperatura durante la producción, la selección del alga parda utilizada como materia prima, procedimientos como el fraccionamiento del peso molecular durante la producción, se pueden producir sales metálicas monovalentes de ácido algínico con diferentes pesos moleculares. Además, puede mezclarse con una sal metálica monovalente de ácido algínico de otro lote que tenga diferente peso molecular o viscosidad, a fin de obtener una sal metálica monovalente de ácido algínico que tenga un peso molecular de interés.

Una sal metálica monovalente de ácido algínico utilizada con la presente invención es preferentemente una solución obtenida disolviendo una sal metálica monovalente de ácido algínico en agua MilliQ hasta una concentración de 1 p/p%, donde la viscosidad aparente medida con un viscosímetro de placa cónica bajo la condición de 20 °C es preferentemente de 40 mPa·s a 800 mPa·s y más preferentemente de 50 mPa·s a 600 mPa·s. Las condiciones para medir la viscosidad aparente se ajustan preferentemente a las descritas a continuación. En el presente documento, la "viscosidad aparente" puede denominarse simplemente "viscosidad".

Aunque el ácido algínico utilizado en la presente invención puede ser de origen natural o sintético, se deriva preferentemente de un origen natural. Algunos ejemplos de ácidos algínicos naturales son los extraídos de las algas pardas. Aunque las algas pardas que contienen ácido algínico ocupan un lugar destacado en las costas marinas de todo el mundo, las algas que realmente pueden utilizarse como materia prima del ácido algínico son limitadas, y los ejemplos típicos de las mismas incluyen *Lessonia*, que se encuentra en Sudamérica, *Macrocystis*, que se encuentra en Norteamérica, *Laminaria* y *Ascophyllum*, que se encuentran en Europa, y *Durvillea*, que se encuentra en Australia. Ejemplos de algas pardas que sirven como materia prima del ácido algínico son el género *Lessonia*, el género *Macrocystis*, el género *Laminaria*, el género *Ascophyllum*, el género *Durvillea*, el género *Eisenia* y el género *Ecklonia*.

### 3. Tratamiento de reducción de endotoxinas

La sal metálica monovalente de ácido algínico utilizada en la presente invención es una sal metálica monovalente de ácido algínico de baja endotoxina. Por endotoxina baja se entiende aquella cuyo nivel de endotoxina se ha reducido sustancialmente hasta un punto que no induce inflamación ni fiebre. Más preferentemente, la sal metálica monovalente de un ácido algínico se somete preferentemente a un tratamiento de reducción de endotoxinas.

El tratamiento de reducción de endotoxinas puede llevarse a cabo mediante un procedimiento conocido o un procedimiento que lo cumpla. Por ejemplo, este tratamiento puede llevarse a cabo mediante el procedimiento de Suga et al. que implica la purificación del hialuronato sódico (véase, por ejemplo, Solicitud de Patente Japonesa Abierta No. H9-324001), el procedimiento de Yoshida et al. que implica la purificación de 01,3-glucano (véase, por ejemplo, Solicitud de Patente Japonesa Abierta No. H8-269102), el procedimiento de William et al. que implica la purificación de un biopolímero como el alginato o la goma gellan (véase, por ejemplo, la Solicitud de Patente Japonesa Publicada No 2002-530440 de la Publicación Internacional PCT), el procedimiento de James et al. que implica la purificación del polisacárido (véase, por ejemplo, el documento WO 93/13136), el procedimiento de Lewis et al. (véase, por ejemplo, Patente de EE. UU. No. 5,589,591), el procedimiento de Hermanfranck et al. que implica la purificación del alginato (véase, por ejemplo, Appl. Microbiol. Biotechnol. (1994), 40:638-643) o un procedimiento que se ajuste a ella. El tratamiento de reducción de endotoxinas divulgado en la presente solicitud no se limita a estos procedimientos, sino que puede llevarse a cabo mediante un procedimiento conocido, tal como la limpieza, la purificación mediante filtración con filtro (filtro de eliminación de endotoxinas o filtro de electrificación), ultrafiltración o una columna (tal como una columna de afinidad de adsorción de endotoxinas, columna de filtración en gel o columna de intercambio iónico), adsorción a una sustancia hidrófoba, resina o carbón activado, tratamiento con disolventes orgánicos (tal como extracción con un disolvente orgánico o precipitación o deposición por adición de disolvente orgánico), tratamiento con tensioactivos (véase, por ejemplo, Solicitud de patente Japonesa abierta No. 2005-036036) o una combinación adecuada de los mismos. Un procedimiento conocido, tal como la separación centrífuga, puede combinarse adecuadamente con estas etapas de tratamiento. El tratamiento de reducción de endotoxinas se selecciona preferentemente de acuerdo con el tipo de ácido algínico.

El nivel de endotoxina puede confirmarse mediante un procedimiento conocido, y puede medirse utilizando un procedimiento conocido, tal como el procedimiento que utiliza el reactivo de Limulus (LAL) o el conjunto Endospecy (marca registrada) ES-24S (Seikagaku Corporation).

Aunque no existen limitaciones particulares en el procedimiento de tratamiento de endotoxinas del ácido algínico contenido en la composición para su uso en el relleno de un núcleo pulposo de un disco intervertebral de la presente invención, el contenido de endotoxina de la sal metálica monovalente de ácido algínico en el caso de medir la endotoxina utilizando un reactivo de limulus (LAL) es preferentemente 500 unidades de endotoxina (UE)/g o menos, más preferentemente 100 UE/g o menos, aún más preferentemente 50 UE/g o menos y particularmente preferentemente 30 UE/g o menos como resultado del mismo. El alginato de sodio que se ha sometido a un tratamiento de reducción de endotoxinas puede adquirirse en forma de productos comerciales tal como Sea Matrix (marca registrada) (Mochida Pharmaceutical), PRONOVA™ UP LVG (FMC BioPolymer) o similares.

#### 4. Preparación de una solución de sal metálica monovalente de ácido algínico

[0051] La composición para su uso en el relleno de un núcleo pulposo de un disco intervertebral de la presente invención puede prepararse utilizando una solución de una sal metálica monovalente de ácido algínico. La solución de una sal metálica monovalente de ácido algínico puede prepararse mediante un procedimiento conocido o que se ajuste al mismo. Es decir, la sal metálica monovalente del ácido algínico para su uso en la presente invención puede producirse mediante un procedimiento conocido, tal como un procedimiento ácido o un procedimiento cálcico, utilizando las algas pardas descritas anteriormente. Más concretamente, tras la extracción de estas algas pardas utilizando una solución acuosa alcalina, tal como una solución acuosa de carbonato sódico, por ejemplo, se puede obtener ácido algínico añadiendo un ácido (tal como ácido clorhídrico o ácido sulfúrico), y se puede obtener una sal de ácido algínico mediante intercambio iónico del ácido algínico. El tratamiento de reducción de endotoxinas se lleva a cabo como se ha descrito anteriormente. No hay limitaciones particulares en cuanto al disolvente de la sal metálica monovalente del ácido algínico siempre que sea un disolvente que pueda aplicarse in vivo, y ejemplos de tales disolventes incluyen agua purificada, agua destilada, agua de intercambio iónico, agua Milli-Q, solución salina fisiológica y solución salina tamponada con fosfato (PBS). Éstos se esterilizan preferentemente y se someten preferentemente a un tratamiento de reducción de endotoxinas. Por ejemplo, puede utilizarse agua Milli-Q después de esterilizarla por filtración.

Cuando la composición para su uso en el relleno de un núcleo pulposo de un disco intervertebral de la presente invención se proporciona en un estado seco como un liofilizado, el disolvente descrito anteriormente se puede utilizar para prepararlo en una solución que tenga fluidez. Además, todas las operaciones de obtención de la composición para su uso en el relleno de un núcleo pulposo de un disco intervertebral de la presente invención se realizan preferentemente en un entorno con un bajo nivel de endotoxinas y un bajo nivel bacteriano. Por ejemplo, las operaciones se realizan preferentemente en un banco limpio utilizando herramientas esterilizadas. Las herramientas utilizadas pueden tratarse con un agente de eliminación de endotoxinas disponible en el mercado.

#### 5. Viscosidad aparente de la composición de la presente invención

Las composiciones para su uso en el relleno de un núcleo pulposo de un disco intervertebral de la presente invención están en un estado líquido que tiene fluidez, es decir, un estado de solución. La composición de la presente invención tiene fluidez cuando se aplica al sitio del núcleo pulposo. En un aspecto de la presente invención, la composición para su uso en el relleno de un núcleo pulposo de un disco intervertebral de la presente invención preferentemente tiene una fluidez que permite la inyección con una aguja 21G después de una hora de reposo a 20 °C. Aunque la viscosidad aparente de la composición de la presente invención en este aspecto no está particularmente limitada siempre que pueda conseguirse el efecto de la presente invención, es preferentemente 10 mPa·s o más, más preferentemente 100 mPa·s o más, aún más preferentemente 200 mPa·s o más y particularmente preferentemente 500 mPa·s o más ya que una viscosidad demasiado baja debilitaría la adhesión al tejido que rodea el sitio aplicado. También es preferentemente de 50.000 mPa·s o menos, más preferentemente de 20.000 mPa·s o menos y aún más preferentemente de 10.000 mPa·s o menos, ya que una viscosidad aparente demasiado alta deterioraría la propiedad de manipulación. Una viscosidad aparente de 20.000 mPa·s o inferior facilitaría la aplicación con jeringa. Sin embargo, la aplicación también es posible, aunque la viscosidad aparente sea de 20.000 mPa·s o más, utilizando una herramienta de llenado a presión o eléctrica u otros medios. La composición para su uso en el relleno de un núcleo pulposo de un disco intervertebral de la presente invención está preferentemente en un intervalo de 10 mPa·s a 50.000 mPa·s, más preferentemente de 100 mPa·s a 30.000 mPa·s, aún más preferentemente de 200 mPa·s a 20.000 mPa·s, aún más preferentemente de 500 mPa·s a 20.000 mPa·s, y particularmente preferentemente de 700 mPa·s a 20.000 mPa·s. En otro aspecto preferible, puede ser de 500 mPa·s a 10.000 mPa·s, o de 2.000 mPa·s a 10.000 mPa·s. Las composiciones para su uso en el relleno de un núcleo pulposo de un disco intervertebral de la presente invención tienen una viscosidad que también permite la aplicación a un sujeto con una jeringa.

La viscosidad aparente de una composición que contiene una sal metálica monovalente de ácido algínico, por ejemplo, una solución acuosa de ácido algínico, puede medirse de acuerdo con un procedimiento común. Por ejemplo, puede utilizarse un viscosímetro rotacional coaxial de doble cilindro, un viscosímetro rotacional de un solo cilindro (viscosímetro Brookfield), un viscosímetro rotacional de placa cónica (viscosímetro de placa cónica) o similares para la medición de acuerdo con el procedimiento del viscosímetro rotacional. Es preferible seguir el procedimiento de medición de la viscosidad de la Farmacopea Japonesa (16ª edición). De acuerdo con la presente invención, la medición de la viscosidad se lleva a cabo preferentemente bajo la condición de 20 °C. Como se describirá más adelante, si la composición para su uso en el llenado de un núcleo pulposo de un disco intervertebral de la presente invención contiene algo que no se puede

disolver en el disolvente, tal como células, la viscosidad aparente de la composición es preferentemente una viscosidad aparente libre de células con el fin de llevar a cabo una medición precisa de la viscosidad.

De acuerdo con la presente invención, una viscosidad aparente de una composición para su uso en el relleno de un núcleo pulposo de un disco intervertebral que contiene una sal metálica monovalente de ácido algínico se mide particularmente con un viscosímetro de placa cónica. Por ejemplo, una medición tiene lugar preferentemente en las siguientes condiciones de medición. Se prepara una solución de muestra con agua MilliQ. La temperatura de medición es de 20 °C. La velocidad de rotación del viscosímetro de placa cónica es de 1 rpm para medir una solución al 1% de la sal metálica monovalente del ácido algínico, 0,5 rpm para medir una solución al 2%, que puede determinarse así sucesivamente. Para la solución al 1% de la sal metálica monovalente del ácido algínico, el tiempo de lectura es de 2 minutos de medición para obtener el promedio de los valores tomados durante el período comprendido entre 1 y 2 minutos después del inicio de dicha medición; y para la solución al 2%, el tiempo de lectura es de 2,5 minutos de medición para obtener el promedio de los valores tomados durante el período comprendido entre 0,5 y 2,5 minutos después del inicio de dicha medición. El valor de ensayo es un valor promedio de tres mediciones.

La viscosidad aparente de la composición para su uso en el relleno de un núcleo pulposo de un disco intervertebral de la presente invención puede ajustarse, por ejemplo, controlando la concentración, el peso molecular, la proporción M/G de la sal metálica monovalente del ácido algínico.

La viscosidad aparente de la solución de sal metálica monovalente de ácido algínico se vuelve alta cuando la concentración de la sal metálica monovalente de ácido algínico en la solución es alta, mientras que la viscosidad se vuelve baja cuando la concentración es baja. Además, la viscosidad aumenta cuando el peso molecular de la sal metálica monovalente del ácido algínico es grande, mientras que la viscosidad disminuye cuando el peso molecular es pequeño.

Dado que la viscosidad aparente de una solución de sal metálica monovalente de ácido algínico se ve afectada por la proporción M/G, por ejemplo, puede seleccionarse adecuadamente un ácido algínico que tenga una proporción M/G más preferible para la viscosidad de la solución o similar. La proporción M/G del ácido algínico utilizado con la presente invención es de aproximadamente 0,1 a 5,0, preferentemente de aproximadamente 0,1 a 4,0 y más preferentemente de aproximadamente 0,2 a 3,5.

Como se ha descrito anteriormente, dado que la proporción M/G viene determinada principalmente por la especie del alga, la especie del alga parda utilizada como materia prima afecta a la viscosidad de la solución de sal metálica monovalente de ácido algínico. El ácido algínico utilizado con la presente invención se deriva preferentemente de un alga parda del género *Lessonia*, del género *Macrocystis*, del género *Laminaria*, del género *Ascophyllum* y del género *Durvillea*, más preferentemente de un alga parda del género *Lessonia*, y particularmente preferentemente derivado de *Lessonia nigrescens*.

## 6. Preparación de la composición de la presente invención

La composición para su uso en el relleno de un núcleo pulposo de un disco intervertebral de la presente invención se caracteriza por contener una sal metálica monovalente de ácido algínico de baja endotoxina como ingrediente activo. Los presentes inventores descubrieron por primera vez que cuando se utiliza una sal metálica monovalente de ácido algínico de baja endotoxina para rellenar un sitio del núcleo pulposo de un cuerpo vivo, la sal metálica monovalente de ácido algínico per se ejerce un efecto para regenerar o tratar el tejido del núcleo pulposo. "Contenida como ingrediente activo" significa que la sal metálica monovalente de ácido algínico de baja endotoxina está contenida en una cantidad eficaz para regenerar o tratar el tejido del núcleo pulposo cuando se aplica al lugar afectado, que es al menos, preferentemente 0,1 p/v% o más, más preferentemente 0,5 p/v% o más y aún más preferentemente 1 p/v% de toda la composición. Aunque una concentración preferible de la sal metálica monovalente del ácido algínico en la composición de la presente invención no puede determinarse incondicionalmente porque se ve afectada por el peso molecular, es preferentemente de 0,5 p/v% a 5 p/v%, más preferentemente de 1 p/v% a 5 p/v%, aún más preferentemente de 1 p/v% a 3 p/v% y particularmente preferentemente de 1,5 p/v% a 2,5 p/v%. Además, en otro aspecto, la concentración de la sal metálica monovalente del ácido algínico en la composición de la presente invención puede ser preferentemente de 0,5 p/p% a 5 p/p%, más preferentemente de 1 p/p% a 5 p/p%, aún más preferentemente de 1 p/p% a 3 p/p% y particularmente preferentemente de 1,5 p/p% a 2,5 p/p%.

Cuando se utiliza una sal metálica monovalente de ácido algínico purificada hasta un nivel preferible de endotoxinas para producir una composición como la descrita anteriormente, el contenido de endotoxinas de la composición suele ser de 500 EU/g o menos, más preferentemente de 300 EU/g o menos, aún más preferentemente de 150 EU/g o menos y particularmente preferentemente de 100 EU/g o menos.

La composición para su uso en el relleno de un núcleo pulposo de un disco intervertebral de la presente invención está preferentemente libre de células. En algunos otros aspectos, las composiciones para su uso en el relleno de un núcleo pulposo de un disco intervertebral de la presente invención utilizan células. Algunos ejemplos de células son las células del núcleo pulposo, las células madre, las células estromales, las células madre mesenquimales y las células estromales de la médula ósea. Aunque sus fuentes no están especialmente limitadas, algunos ejemplos son el núcleo pulposo de un

disco intervertebral, la médula ósea, el tejido adiposo y la sangre del cordón umbilical. Las células también incluyen células ES no humanas y células iPS.

La frase "utilizar células" se refiere a la adición de células a la composición de la presente invención, en donde las células se preparan, según sea necesario, mediante un procedimiento en donde las células de interés se recogen y concentran a partir de un núcleo pulposo de un disco intervertebral, una médula ósea, un tejido adiposo, una sangre de cordón umbilical, o un procedimiento en donde las células se cultivan para aumentar la cantidad de las mismas. Específicamente, las células están contenidas en la composición de la presente invención, por ejemplo, para  $1 \times 10^4$  células/ml o más,  $1 \times 10^5$  células/ml o más, preferentemente de  $1 \times 10^4$  células/ml a  $1 \times 10^7$  células/ml. Las células pueden estar disponibles en el mercado.

La composición para su uso en el relleno de un núcleo pulposo de un disco intervertebral de la presente invención también puede contener un factor para promover el crecimiento de las células. Algunos ejemplos de estos factores son BMP, FGF, VEGF, HGF, TGF- $\beta$ , IGF-1, PDGF, CDMP (proteína morfogenética derivada del cartílago), CSF, EPO, IL, PRP (Plasma Rico en Plaquetas), SOX e IF. Estos factores pueden producirse mediante un procedimiento de recombinación o pueden purificarse a partir de una composición proteica. En este caso, las composiciones de algunos aspectos de la presente invención no contienen estos factores de crecimiento. Sin embargo, incluso en el caso de no contener factor de crecimiento, la regeneración del núcleo pulposo es adecuadamente satisfactoria, y la seguridad es mayor que en el caso de promover agresivamente el crecimiento celular.

La composición de la presente invención puede contener factores para suprimir la muerte celular. Ejemplos de un factor que induce la muerte celular incluyen Caspasa y TNF $\alpha$ , y ejemplos de un factor para suprimirlos incluyen un anticuerpo y ARNsi. Dichos factores para suprimir la muerte celular pueden producirse mediante un procedimiento de recombinación o pueden purificarse a partir de una composición proteica. Aquí, las composiciones en algunos aspectos de la presente invención no contienen tales factores para suprimir la muerte celular. Sin embargo, incluso en el caso de no contener factores para suprimir la muerte celular, la regeneración del núcleo pulposo es adecuadamente satisfactoria, y la seguridad es mayor que en el caso de suprimir agresivamente la muerte celular.

Además, en un aspecto de la presente invención, la composición para su uso en el relleno de un núcleo pulposo de un disco intervertebral de la presente invención no contiene un componente que demuestre acción farmacológica sobre un tejido del núcleo pulposo de un disco intervertebral que no sea una sal metálica monovalente de ácido alginico de baja endotoxina. Una composición que contiene como ingrediente activo de la misma únicamente una sal metálica monovalente de ácido alginico de baja endotoxina también es capaz de demostrar efectos adecuados para regenerar o tratar un núcleo pulposo.

En particular, la composición para su uso en el relleno de un núcleo pulposo de un disco intervertebral de la presente invención también puede contener componentes utilizados habitualmente en productos farmacéuticos, tal como otros ingredientes farmacéuticamente activos y estabilizadores, emulsionantes, ajustadores de la presión osmótica, tampones, agentes isotónicos, conservantes, analgésicos o colorantes utilizados habitualmente, según sea necesario.

## 7. Curado de la composición de la presente invención

La composición para su uso en el relleno de un núcleo pulposo de un disco intervertebral de la presente invención se utiliza de tal manera que se cura parcialmente después de aplicarse al sitio del núcleo pulposo. "Parcialmente curado" significa poner en contacto un agente reticulante con una parte de la composición de la presente invención que tenga fluidez, de modo que gelifique y solidifique no toda la composición, sino una parte de la misma en contacto con el agente reticulante. Preferentemente, el agente reticulante se pone en contacto con al menos una parte de la superficie de la composición de la presente invención que tiene fluidez para curar una parte de la composición de la presente invención. En algunos aspectos de la presente invención, "la composición está parcialmente curada después de aplicarse al sitio del núcleo pulposo" significa que al menos el 50% del volumen de la composición en un tubo de ensayo de 6 mm de diámetro no está gelificado cuando el tubo de ensayo se rellena con 500  $\mu$ l de un alginato sódico de baja endotoxina y un agente reticulante empleando el mismo procedimiento y proporción para utilizar el agente reticulante que los empleados para rellenar el sitio del núcleo pulposo, y dejando reposar el resultante durante una hora *in vitro* de acuerdo con el Ejemplo 4 de la presente especificación, donde la parte no gelificada puede representarse por succión de al menos el 50% del volumen de la composición en el tubo de ensayo utilizando una jeringa con una aguja 21G. Mientras la composición muestre tal propiedad después de rellenarse en el sitio del núcleo pulposo, se considera que la composición no se desviaría de la misma incluso cuando se aplique fuerza de compresión desde los lados de la cabeza y la cola del disco intervertebral después del relleno. "Al menos una parte de la superficie de la composición" se refiere, por ejemplo, a una abertura en la superficie del disco intervertebral que conduce al núcleo pulposo, preferentemente, una abertura en la superficie del disco intervertebral que se utiliza para aplicar la composición al sitio del núcleo pulposo, es decir, una entrada para rellenar la composición. La solidificación de al menos una parte de la superficie de la composición mediante gelificación puede evitar eficazmente la fuga de la composición del disco intervertebral. Una entrada de llenado de la composición en la superficie del disco intervertebral es, por ejemplo, preferentemente una abertura formada en la superficie del disco intervertebral con una aguja de una jeringa o un bisturí para llenar la composición, o una abertura en la superficie del disco intervertebral formada con un bisturí o similar tras la resección de la hernia discal. En este aspecto, un disco intervertebral se refiere preferentemente a un anillo fibroso.

Preferentemente, la composición para su uso en el relleno de un núcleo pulposo de un disco intervertebral de la presente invención no contiene un agente reticulante en una cantidad que resulte en el curado de la composición antes de la aplicación a un sitio del núcleo pulposo de un sujeto. Por lo tanto, la composición para su uso en el relleno de un núcleo pulposo de un disco intervertebral de la presente invención puede contener un agente reticulante en una cantidad que no resulte en el curado de la composición incluso después de un cierto período de tiempo. En el presente documento, un cierto período de tiempo se refiere, pero no se limita particularmente a, preferentemente aproximadamente de 30 min a 12 h. La frase "no contiene un agente reticulante en una cantidad que resulte en el curado de la composición" puede representarse, por ejemplo, porque la composición es inyectable con una jeringa con una aguja 21G después de permanecer a 20°C durante una hora. Las composiciones en algunos aspectos de la presente invención están libres de un agente reticulante.

No existen limitaciones particulares sobre el agente reticulante siempre que sea capaz de solidificar una superficie de una solución de una sal metálica monovalente de ácido algínico mediante la reticulación de dicha solución. Entre los ejemplos de agente reticulante se incluyen compuestos de iones metálicos divalentes o más, tales como  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ ,  $\text{Ba}^{2+}$  y  $\text{Sr}^{2+}$ , y reactivos reticulantes que tengan de 2 a 4 grupos amino en una molécula de los mismos. Ejemplos específicos de compuestos de iones metálicos divalentes o más incluyen  $\text{CaCl}_2$ ,  $\text{MgCl}_2$ ,  $\text{CaSO}_4$ ,  $\text{BaCl}_2$ , mientras que ejemplos específicos de reactivos reticulantes que tienen de 2 a 4 grupos amino en una molécula de los mismos incluyen diaminoalcanos que opcionalmente tienen un grupo lisilo ( $-\text{COCH}(\text{NH}_2)-(\text{CH}_2)_4-\text{NH}_2$ ) en un átomo de nitrógeno, es decir, derivados que forman grupos lisilamino como resultado de que un diaminoalcano y un grupo amino del mismo estén sustituidos con un grupo lisilo. Aunque entre sus ejemplos específicos se incluyen el diaminoetano, el diaminopropano y el N-(lisil)-diaminoetano, la solución de  $\text{CaCl}_2$  es particularmente preferible por razones como la facilidad de adquisición y la resistencia del gel.

El momento de poner en contacto el agente reticulante con la superficie de la composición para su uso en el relleno de un núcleo pulposo de un disco intervertebral de la presente invención es preferentemente después de la aplicación de la composición al sitio del núcleo pulposo. Un procedimiento para poner en contacto un agente reticulante (por ejemplo, un ion metálico divalente o de mayor valencia) con una parte de la composición para su uso en el relleno de un núcleo pulposo de un disco intervertebral de la presente invención no está particularmente limitado y puede ser, por ejemplo, un procedimiento en donde se aplica una solución del ion metálico divalente o de mayor valencia a la superficie de la composición con una jeringa, o un pulverizador. Por ejemplo, se puede aplicar un agente reticulante de forma continua y lenta sobre la entrada de composición-relleno formada en el disco intervertebral, empleando desde varios segundos hasta más de 10 s. A continuación, si es necesario, se puede añadir un tratamiento para eliminar el agente reticulante que queda en las proximidades de la entrada de relleno. El agente reticulante puede eliminarse, por ejemplo, lavando la parte aplicada con una solución salina fisiológica.

Preferentemente, la cantidad del agente reticulante utilizado se ajusta adecuadamente teniendo en cuenta la cantidad de la composición aplicada, el tamaño de la entrada en la superficie del disco intervertebral para llenar la composición, o el tamaño del sitio del núcleo pulposo del disco intervertebral a aplicar. Con el fin de no afectar fuertemente el tejido que rodea la entrada de composición-relleno con el agente reticulante, la cantidad del agente reticulante utilizado se controla para que no sea demasiado. La cantidad del ion metálico divalente o de mayor valencia utilizado no está particularmente limitada siempre que la superficie de la composición que contiene la sal metálica monovalente de un ácido algínico pueda solidificarse. Cuando, por ejemplo, se utiliza una solución de  $\text{CaCl}_2$  100 mM, la cantidad de solución de  $\text{CaCl}_2$  utilizada es preferentemente de aproximadamente 0,3 ml a 5,0 ml, y más preferentemente de aproximadamente 0,5 ml a 3,0 ml si el diámetro de la entrada de relleno en la superficie del disco intervertebral es de aproximadamente 1 mm. Cuando la entrada de relleno en la superficie del disco intervertebral se forma con un bisturí o similar tras la resección de la hernia discal con los bordes de aproximadamente 5 mm × 10 mm, la cantidad de solución de  $\text{CaCl}_2$  100 mM utilizada es preferentemente aproximadamente 0,3 ml a 10 ml y más preferentemente aproximadamente 0,5 ml a 6,0 ml. La cantidad puede aumentarse o disminuirse convenientemente mientras se observa el estado de la composición en el lugar aplicado.

En el caso de que el agente reticulante contenga calcio, se sabe que una mayor concentración de calcio produce una gelificación rápida y la formación de un gel más duro. Sin embargo, puesto que el calcio tiene citotoxicidad, si la concentración es demasiado alta, puede tener un riesgo de afectar negativamente a la acción de la composición para su uso en el relleno de un núcleo pulposo de un disco intervertebral de la presente invención para regenerar el núcleo pulposo de un disco intervertebral. Por lo tanto, en el caso de utilizar una solución de  $\text{CaCl}_2$  para solidificar la superficie de una composición que contiene una sal metálica monovalente de ácido algínico, por ejemplo, la concentración de calcio se establece preferentemente a 25 mM a 200 mM y más preferentemente a 50 mM a 150 mM.

El agente reticulante que queda en el sitio añadido después de añadir el agente reticulante a la composición y dejar reposar el resultante durante cierto tiempo, se elimina preferentemente por lavado. Si bien el período de tiempo durante el cual se deja reposar la composición no está especialmente limitado, es preferible dejarla reposar durante un minuto o más, y más preferentemente durante 4 minutos o más, para gelificar la superficie de la composición. Alternativamente, se deja reposar preferentemente de 1 a 10 minutos, más preferentemente de 4 a 10 minutos, de 4 a 7 minutos y aún más preferentemente unos 5 minutos. La composición y el agente reticulante están preferentemente en contacto durante este cierto período de tiempo, y puede añadirse adecuadamente un agente reticulante para que la superficie líquida de la composición no se seque.

Por ejemplo, las perlas de alginato pueden obtenerse dejando caer una solución de alginato de sodio en una solución de

CaCl<sub>2</sub> para formar gel. Sin embargo, las perlas de alinato deben aplicarse presionándolas en el lugar de aplicación y deben tener un tamaño adecuado para el lugar de aplicación, lo que resulta técnicamente difícil en la práctica clínica real. Además, cuando se utiliza una solución de CaCl<sub>2</sub> como agente reticulante, el ion Ca de la superficie de la microesfera entra en contacto con el tejido circundante, lo que provoca un problema de citotoxicidad del calcio. Por otra parte, la composición para su uso en el relleno de un núcleo pulposo de un disco intervertebral de la presente invención en estado de solución puede aplicarse fácilmente a sitios que tengan cualquier tipo de forma y puede cubrir toda el área del sitio a aplicar con buena adhesión al tejido circundante. La concentración de calcio de la parte de la composición para su uso en el relleno de un núcleo pulposo de un disco intervertebral de la presente invención que hace contacto con el tejido circundante puede mantenerse baja y, por lo tanto, el problema de la citotoxicidad del calcio es pequeño. Dado que la parte de la composición para su uso en el relleno de un núcleo pulposo de un disco intervertebral de la presente invención que entra en contacto con el tejido circundante se ve menos afectada por el agente reticulante, la composición puede entrar fácilmente en contacto con las células y el tejido del lugar a aplicar. Preferentemente, la composición para su uso en el relleno de un núcleo pulposo de un disco intervertebral de la presente invención se fusiona con el tejido del cuerpo vivo en el sitio aplicado hasta un nivel imperceptible en aproximadamente 4 semanas después de la aplicación en el sitio del núcleo pulposo, con alta afinidad al cuerpo vivo.

Cuando una parte de la composición para su uso en el relleno de un núcleo pulposo de un disco intervertebral de la presente invención se gelifica con el agente reticulante al aplicar la composición de la presente invención al sitio del núcleo pulposo, la composición se cura en una parte del sitio afectado y se localiza allí en el estado de estar adherida al tejido circundante, evitando así la fuga del sitio del núcleo pulposo. Además, como resultado de adherir la composición para su uso en el relleno de un núcleo pulposo de un disco intervertebral de la presente invención al tejido circundante, los efectos de regeneración del núcleo pulposo de la composición de la presente invención pueden demostrarse más potentemente.

Cuando el material de relleno que se aplica en el sitio del núcleo pulposo estaba completamente gelificado y curado como ejemplo comparativo en los ejemplos de la presente solicitud, se observó un fenómeno en donde el gel curado se desviaba de la entrada de relleno de la composición en la superficie del disco intervertebral cuando se ejercía una fuerza de compresión sobre el disco intervertebral desde los lados de la cabeza y la cola. Por otra parte, cuando la composición para su uso en el relleno de un núcleo pulposo de un disco intervertebral de la presente invención en estado de solución se utilizó para rellenar el sitio del núcleo pulposo, no hubo desviación de la entrada de relleno en la superficie del disco intervertebral incluso cuando se aplicó fuerza de compresión desde los lados de la cabeza y la cola. Específicamente, el riesgo de que la composición de relleno se escape es pequeño incluso contra la compresión al disco intervertebral desde la dirección vertical cuando la composición de la presente invención se utiliza realmente para rellenar el núcleo pulposo.

Además, cuando un gel curado rellena el sitio del núcleo pulposo, el gel curado puede tener el riesgo de sobresalir en el canal espinal, lo que puede causar una neuropatía grave. Por otra parte, la composición para su uso en el relleno de un núcleo pulposo de un disco intervertebral de la presente invención en estado de solución apenas se asocia a tal riesgo, con escaso riesgo de aparición de complicaciones.

#### 8. Aplicación de la composición

La composición para su uso en el relleno de un núcleo pulposo de un disco intervertebral de la presente invención puede aplicarse a un sitio del núcleo pulposo de un disco intervertebral de un humano o de un organismo que no sea humano, por ejemplo, un ave o un mamífero no humano (por ejemplo, bovino, mono, gato, ratón, rata, cobaya, hámster, cerdo, perro, conejo, oveja o caballo) para promover la regeneración del núcleo pulposo del mismo.

La composición para su uso en el relleno de un núcleo pulposo de un disco intervertebral de la presente invención está preferentemente en un estado líquido que tiene fluidez, es decir, en un estado de solución. En la presente invención, la frase "que tiene fluidez" se refiere a tener una propiedad que hace que la forma de la misma cambie a una forma amorfa, y no requiere que la forma tenga constantemente la propiedad de fluir a la manera de un líquido, por ejemplo. Preferentemente, tiene una fluidez que permite que la composición sea sellada en una jeringa e inyectada en un sitio del núcleo pulposo de un disco intervertebral. Además, la composición tiene preferentemente una fluidez que permite inyectarla en el núcleo pulposo de un disco intervertebral con una jeringa provista de una aguja 14G-26G, más preferentemente una aguja 21G, después de dejarla reposar a 20 °C durante una hora. Cuando la composición para su uso en el llenado de un núcleo pulposo de un disco intervertebral de la presente invención se proporciona en un estado seco como un liofilizado, se puede hacer en una composición para tener la fluidez descrita anteriormente con un disolvente a la aplicación.

La composición de la presente invención en estado de solución puede aplicarse fácilmente a un sitio del núcleo pulposo de un disco intervertebral con una jeringa, una pipeta para gel, una jeringa especializada, un inyector especializado o una herramienta de llenado. Dado que la aplicación con jeringa es difícil cuando la viscosidad de la composición es elevada, puede utilizarse una jeringa presurizada o eléctrica. Incluso sin jeringa, la aplicación en una parte defectuosa del núcleo pulposo puede realizarse, por ejemplo, con una espátula o un bastoncillo. Cuando se utiliza una jeringa para la inyección, por ejemplo, se emplea preferentemente una aguja 14G-27G o 14G-26G.

Aunque la aplicación de la composición para su uso en el relleno de un núcleo pulposo de un disco intervertebral de la presente invención al sitio del núcleo pulposo no está particularmente limitada, la composición se aplica preferentemente

al sitio del núcleo pulposo utilizando una jeringa, una herramienta de relleno después de exponer el sitio afectado mediante un procedimiento quirúrgico conocido bajo visión directa, o bajo un microscopio o un endoscopio. En un aspecto preferible, una aguja de una herramienta de relleno puede insertarse desde la superficie del anillo fibroso hacia el sitio del núcleo pulposo para aplicar la composición para su uso en el relleno de un núcleo pulposo de un disco intervertebral de la presente invención.

Puesto que la composición para su uso en el relleno de un núcleo pulposo de un disco intervertebral de la presente invención está en estado de solución, puede adaptarse a un sitio del núcleo pulposo con cualquier forma, incluyendo la contracción del núcleo pulposo y una cavidad o una parte defectuosa del sitio del núcleo pulposo, de tal manera que puede rellenar toda la contracción, cavidad o parte defectuosa. El encogimiento del núcleo pulposo y de la cavidad y la parte defectuosa del sitio del núcleo pulposo puede ser el resultado de la degeneración o lesión del disco intervertebral o de la extirpación o succión de al menos una parte del núcleo pulposo mediante una operación quirúrgica. Preferentemente, la composición de la presente invención se aplica a una parte defectuosa del núcleo pulposo que se forma al extirpar al menos una parte del núcleo pulposo.

Aunque la extracción de al menos una parte del núcleo pulposo no está particularmente limitada, puede ser, por ejemplo, una nucleotomía intervertebral realizada bajo visión directa, transdérmica, bajo visión microscópica o endoscópicamente. Alternativamente, por ejemplo, se puede realizar una incisión de 2 cm a 10 cm en la espalda para extirpar el músculo de la superficie posterior del elemento posterior de la columna vertebral llamado arco vertebral para reseca el ligamento entre los arcos vertebrales, confirmar la hernia del nervio y del disco, y extirpar la hernia que presiona el nervio (procedimiento de Love). Alternativamente, el núcleo pulposo puede irradiarse con láser para reducir su volumen.

Tras la aplicación de la composición para su uso en el relleno de un núcleo pulposo de un disco intervertebral de la presente invención al núcleo pulposo, la composición puede curarse parcialmente con un agente reticulante como se ha descrito anteriormente.

Si bien la cantidad de la composición para su uso en el relleno de un núcleo pulposo de un disco intervertebral de la presente invención aplicada no está particularmente limitada y puede determinarse de acuerdo con el volumen del sitio aplicado del núcleo pulposo del sujeto a aplicar, puede ser, por ejemplo, de 0,01 ml a 10 ml, más preferentemente, de 0,1 ml a 5 ml y aún más preferentemente de 0,2 ml a 3 ml. Cuando la composición se aplica a la parte defectuosa del núcleo pulposo, se inyecta preferentemente de forma que llene suficientemente el volumen de la parte defectuosa del núcleo pulposo.

El número de veces y la frecuencia de la aplicación de la composición para su uso en el relleno de un núcleo pulposo de un disco intervertebral de la presente invención puede aumentarse o disminuirse de acuerdo con los síntomas y el efecto. Por ejemplo, puede tratarse de una aplicación única o de una aplicación periódica una vez al mes o al año. Dado que el ácido algínico no existe de forma natural en el organismo de los animales, éstos no poseen una enzima que lo degrade específicamente. Mientras que un ácido algínico puede degradarse gradualmente en el cuerpo de un animal debido a la hidrólisis general, su degradación en el cuerpo es más suave en comparación con un polímero como el ácido hialurónico. Además, dado que no existe ningún vaso sanguíneo en el núcleo pulposo, se espera que el efecto del ácido algínico dure mucho tiempo cuando se rellena dentro del núcleo pulposo.

Incluso cuando la composición para su uso en el relleno de un núcleo pulposo de un disco intervertebral de la presente invención se proporciona sin las células o factores de crecimiento descritos anteriormente, la composición de la presente invención se puede utilizar en combinación con las células, factores de crecimiento, factores supresores de la muerte celular y otros fármacos mencionados a continuación descritos anteriormente en la aplicación al sitio del núcleo pulposo.

La composición para su uso en el relleno de un núcleo pulposo de un disco intervertebral de la presente invención ejerce los efectos de suprimir los cambios degenerativos en todo el tejido del disco intervertebral y el núcleo pulposo y promover la regeneración al aplicarse en el sitio del núcleo pulposo. Por lo tanto, la composición para su uso en el relleno de un núcleo pulposo de un disco intervertebral de la presente invención puede utilizarse favorablemente como una composición para el relleno de un núcleo pulposo de un disco intervertebral.

Uno de los aspectos preferibles de la composición para su uso en el relleno de un núcleo pulposo de un disco intervertebral de la presente invención es su uso para suprimir la degeneración de un disco intervertebral, y más preferentemente para suprimir la degeneración de un núcleo pulposo de un disco intervertebral. "Degeneración de un disco intervertebral o de un núcleo pulposo" significa que el número de células, el contenido de agua, la matriz extracelular (colágeno de tipo II, aggrecan) de un disco intervertebral disminuyen debido al envejecimiento o similares para dar lugar a cambios morfológicos y disfunción, y, si progresan, el disco intervertebral ya no puede realizar una función como amortiguador. En la presente solicitud, no se requiere necesariamente que la "supresión de la degeneración" resulte en un estado sin degeneración, sino que puede resultar en que el cambio degenerativo se suprima en comparación con un caso no tratado.

Un aspecto de la composición para su uso en el relleno de un núcleo pulposo de un disco intervertebral de la presente invención es su uso para regenerar un núcleo pulposo. La regeneración de un núcleo pulposo tiene como objetivo evitar la acumulación de células similares a fibroblastos para regenerar un núcleo pulposo con una elevada proporción de células del núcleo pulposo, y pretende regenerar un tejido del núcleo pulposo rico en colágeno de tipo II y proteoglicano. El término

regeneración de un núcleo pulposo también comprende suprimir la degeneración del núcleo pulposo. Se prefiere que la composición que compone el núcleo pulposo regenerado mediante la aplicación de la composición para su uso en el relleno de un núcleo pulposo de un disco intervertebral de la presente invención sea preferentemente próxima a la composición que compone un núcleo pulposo normal natural.

Además, la composición para su uso en el relleno de un núcleo pulposo de un disco intervertebral puede utilizarse para tratar, prevenir o suprimir la recurrencia de una degeneración de disco intervertebral y/o una lesión de disco intervertebral. En el presente documento, "tratamiento, prevención o supresión de la recurrencia" comprende el tratamiento, la prevención, la supresión de la recurrencia, la reducción, la supresión, la mejora, la eliminación, la reducción de la tasa de inicio, el retraso del inicio, la supresión del progreso, el alivio de la gravedad, la reducción de la tasa de recurrencia, el retraso de la recurrencia y el alivio de los síntomas clínicos.

Una degeneración del disco intervertebral y/o una lesión del disco intervertebral es, por ejemplo, al menos una afección o enfermedad seleccionada del grupo que consiste en hernia discal, discopatía, espondilolistesis degenerativa, discitis piógena, espondilosis deformante, estenosis del canal espinal y una lesión del disco intervertebral.

#### 9. Procedimiento terapéutico

Cualquier referencia a un procedimiento de tratamiento en esta solicitud debe considerarse como una referencia a una composición para su uso en dicho procedimiento.

Se describe además en el presente documento un procedimiento para tratar, prevenir o suprimir la recurrencia de una degeneración de disco intervertebral y/o una lesión de disco intervertebral mediante el uso de la composición descrita anteriormente para su uso en el relleno de un núcleo pulposo de un disco intervertebral de la presente invención. Un procedimiento terapéutico es un procedimiento para tratar, prevenir o suprimir la recurrencia de una degeneración de disco intervertebral y/o una lesión de disco intervertebral, el procedimiento comprende aplicar una composición que tiene fluidez que comprende una sal metálica monovalente de baja endotoxina de ácido alginico a un sitio del núcleo pulposo de un disco intervertebral de un sujeto que necesita dicho tratamiento, prevención o supresión de recurrencia, y curar parcialmente la composición aplicada.

El procedimiento terapéutico puede comprender un paso de eliminación de al menos una parte del núcleo pulposo antes de aplicar la composición de la presente invención al sitio del núcleo pulposo.

La degeneración del disco intervertebral y/o la lesión del disco intervertebral es, por ejemplo, al menos una afección o enfermedad seleccionada del grupo que consiste en hernia discal, discopatía, espondilolistesis degenerativa, discitis piógena, espondilosis deformante, estenosis del canal espinal y una lesión del disco intervertebral. De acuerdo con los procedimientos terapéuticos, la degeneración del disco intervertebral y/o la lesión del disco intervertebral es una hernia discal, y en particular una hernia discal lumbar.

Además, un procedimiento para suprimir el cambio degenerativo en un disco intervertebral utiliza la composición descrita anteriormente para su uso en el relleno de un núcleo pulposo de un disco intervertebral de la presente invención.

Estos procedimientos comprenden aplicar una composición que contiene una sal metálica monovalente de baja endotoxina de ácido alginico y que tiene fluidez a un sitio del núcleo pulposo de un disco intervertebral de un sujeto que necesita suprimir la degeneración del disco intervertebral o que necesita regenerar un núcleo pulposo, y curar parcialmente la composición aplicada. El procedimiento descrito anteriormente puede comprender un paso de eliminación de al menos una parte del núcleo pulposo antes de aplicar la composición de la presente invención al sitio del núcleo pulposo.

Además, un fármaco coadministrado, por ejemplo, un antibiótico tal como estreptomycin, penicilina, tobramicina, amikacina, gentamicina, neomicina o anfotericina B, un agente antiinflamatorio tal como aspirina, un antiinflamatorio no esteroideo (AINE) o paracetamol, una proteinasa, un fármaco corticosteroide o un inhibidor de la HMG-CoA reductasa, como simvastatina o lovastatina, pueden administrarse antes, simultáneamente o después de la aplicación de la composición para su uso en el relleno de un núcleo pulposo de un disco intervertebral de la presente invención al sitio del núcleo pulposo. Estos fármacos también pueden utilizarse mezclados en la composición de la presente invención. Alternativamente, pueden administrarse por vía oral o parenteral para su coadministración. Además, si es necesario, puede administrarse por vía oral o parenteral un relajante muscular, un analgésico opiáceo, un fármaco analgésico neurogénico o similar.

Además, las células descritas anteriormente pueden aplicarse al sitio del núcleo pulposo junto con la composición para su uso en el relleno de un núcleo pulposo de un disco intervertebral de la presente invención. Alternativamente, un factor para promover el crecimiento de tales células puede aplicarse al sitio del núcleo pulposo junto con la composición para su uso en el relleno de un núcleo pulposo de un disco intervertebral de la presente invención. Alternativamente, la composición para su uso en el relleno de un núcleo pulposo de un disco intervertebral de la presente invención no se combina con las células descritas anteriormente. Alternativamente, la composición para su uso en el relleno de un núcleo pulposo de un disco intervertebral de la presente invención no se combina con un factor para promover el crecimiento de

las células. La composición para su uso en el relleno de un núcleo pulposo de un disco intervertebral de la presente invención puede promover la regeneración de un núcleo pulposo incluso sin utilizar dichas células o factores.

Se describe además la fabricación de una composición para su uso en el relleno de un núcleo pulposo de un disco intervertebral de la presente invención mediante el uso de una sal metálica monovalente de ácido algínico de baja endotoxina.

Se describe además una sal metálica monovalente de baja endotoxina de ácido algínico que se utiliza para tratar, prevenir o suprimir la recurrencia de una degeneración de disco intervertebral y/o una lesión de disco intervertebral, en donde una composición que comprende la sal metálica monovalente de baja endotoxina de ácido algínico y que tiene fluidez se aplica a un sitio del núcleo pulposo de un disco intervertebral de un sujeto que necesita tratamiento, prevención o supresión de la recurrencia de la degeneración del disco intervertebral y/o de la lesión del disco intervertebral, y la composición aplicada se cura parcialmente.

#### 10. Preparación liofilizada y kit

La presente invención proporciona un kit para rellenar un núcleo pulposo de un disco intervertebral. El kit de la presente invención comprende una composición para su uso de una sal metálica monovalente de baja endotoxina de ácido algínico de la presente invención como se ha descrito anteriormente. La composición contenida en el kit de la presente invención se encuentra en estado de solución o en estado seco, preferentemente en estado seco, más preferentemente liofilizado, y particularmente preferentemente en polvo liofilizado. Cuando la composición de la presente invención está en estado seco, el kit contiene preferentemente un disolvente de disolución (por ejemplo, agua inyectable). El kit de la presente invención comprende además un agente reticulante. El kit de la presente invención puede comprender además una jeringa, una aguja, una pipeta para gel, una unidad de llenado especializada, instrucciones.

Un ejemplo específico de un kit preferible es un kit que comprende (1) un vial en donde se sella un liofilizado de un alginato de sodio de baja endotoxina, (2) una ampolla en donde se sella un disolvente como agua inyectable como líquido de disolución, (3) una ampolla en donde se sella un compuesto de iones metálicos divalentes o de mayor valencia como una solución de cloruro de calcio como agente reticulante, en un solo envase. Otro ejemplo de kit es aquel en donde una sal metálica monovalente de ácido algínico está sellada en un compartimento de una jeringa compuesta por dos compartimentos formados integralmente y divididos por un tabique, y un disolvente como líquido disolvente o una solución que contiene un agente reticulante está sellado en el otro compartimento, y está compuesto de tal manera que el tabique entre los compartimentos puede penetrarse fácilmente en el momento de su uso para permitir que el contenido de ambos compartimentos se utilice mezclándose y disolviéndose en el momento de su uso. Otro ejemplo de kit es el de una solución de sal metálica monovalente de ácido algínico sellada en una jeringa precargada que permite administrarla directamente en el momento de su uso sin necesidad de un procedimiento de preparación. Otro ejemplo es un kit en donde una solución de ácido algínico y un agente reticulante se sellan en jeringas separadas y se envasan juntos en un solo paquete. Alternativamente, puede tratarse de un kit que comprende un vial lleno de una solución de sal metálica monovalente de ácido algínico, una ampolla en donde está sellado un agente reticulante. La "composición para su uso de una sal metálica monovalente de ácido algínico de baja endotoxina de la presente invención", el "agente reticulante" y la "jeringa" son como se han descrito anteriormente.

El kit de la presente invención puede, por ejemplo, utilizarse en un procedimiento terapéutico como el descrito anteriormente.

#### EJEMPLOS

Aunque la presente invención se describirá con más detalle mediante los siguientes ejemplos.

#### **Ejemplo 1: Efecto del alginato sódico bajo en endotoxinas sobre las células del disco intervertebral humano**

##### **1-(1) Aislamiento y cultivo de células de disco intervertebral humano no degenerado**

Se recogió un tejido del núcleo pulposo de un tejido de disco intervertebral humano no degenerado y se trató en un DMEM (medio de Eagle modificado de Dulbecco) que contenía 0,25% de colagenasa (Wako) a 37 °C durante 4 h para aislar las células del núcleo pulposo. Las células del núcleo pulposo resultantes se cultivaron utilizando DMEM con 1 % de penicilina/estreptomicina, 1,25 µg/ml de fungizona (Invitrogen) y 10 % de FBS (suero bovino fetal) como solución de cultivo en condiciones de 37 °C, 5 % de CO<sub>2</sub> y 20 % de O<sub>2</sub> para utilizar células de segundo paso en los experimentos.

##### **1-(2) Preparación y cultivo de perlas de alginato**

Para cultivar y comparar las células del núcleo pulposo humano se utilizaron dos tipos de alginatos de sodio, es decir, (A) un alginato de sodio que había recibido un tratamiento de reducción de endotoxinas (Mochida Pharmaceutical) y (B) un alginato de sodio de grado alimentario (grado comercial) (Wako Pure Chemical, 199-09961) que se muestra en la Tabla 1 a continuación.

Se utilizó agua Milli-Q para preparar las respectivas soluciones de alginato de sodio a una concentración de 2 p/v %.  $4.0 \times 10^6$  células del núcleo pulposo humano obtenidas en (1) se suspendieron en 1,0 ml de cada una de estas soluciones de alginato sódico. La suspensión celular se introdujo en una solución acuosa de cloruro cálcico 102 mM con una aguja de calibre 22 y se dejó durante 10 minutos, con lo que se prepararon perlas que encapsulaban la solución de alginato sódico que contenía las células del núcleo pulposo.

Las perlas resultantes se lavaron dos veces con solución salina fisiológica al 0,9 % y se colocaron en una solución de cultivo DMEM que contenía 1 % de penicilina/estreptomicina, 1,25 µg/ml de fungizona y 10 % de FBS para cultivarse tridimensionalmente (3D) en condiciones de 37 °C, 5 % de CO<sub>2</sub> y 20 % de O<sub>2</sub>. Las células se recogieron 48 h, 7, 14 y 28 d después del inicio del cultivo, y se utilizaron para las siguientes evaluaciones.

[Tabla 1]

	Alginato de sodio	Viscosidad (concentración 1 %)	mPa·s	Concentración de endotoxinas (EU/g)
A	Alginato de sodio bajo en endotoxinas	300-600		Menos del 50
		*1		
B	Alginato de sodio de calidad alimentaria	500-600		75950
		*2		
*1 Medición con un viscosímetro rotacional *2 de acuerdo con la página web de Wako Pure Chemical				

#### 1-(3) Evaluación del porcentaje de células viables

Las perlas se recogieron 48 h, 7, 14 y 28 d después del inicio del cultivo, se sumergieron y disolvieron en una solución acuosa de citrato sódico 55 mM a 4 °C durante 20 min, y se sometieron a centrifugación para recoger las células. Se utilizaron 5 µM de calceína AM y 1,5 µM de yoduro de propidio (PI) para teñir las células obtenidas, que se observaron con un microscopio láser confocal (Olympus, FV300). Se utilizó ImageJ (National Institutes of Health, Bethesda, MD, EE. UU.) para calcular el porcentaje de células viables considerando las células positivas para calceína AM como células viables y las células positivas para PI como células muertas. En cada punto temporal de recogida de células, n fue de 5 (n = 5).

Los resultados obtenidos de los análisis estadísticos de los ejemplos expuestos en el presente documento se indicaron como valor medio ± desviación estándar (media ± DE). Se empleó la prueba t de Student para la comparación entre dos grupos y la prueba Steel-Dwass para la comparación entre varios grupos. La significación estadística se determinó sobre la base de p<0,05.

Como resultado, los porcentajes de células viables en el Grupo A (alginato sódico de baja endotoxina) y en el Grupo B (alginato sódico de calidad alimentaria) fueron de aproximadamente el 90 % en todos los puntos temporales, es decir, 48 h, 7, 14 y 28 d después del inicio del cultivo, y no se encontraron diferencias en los porcentajes de células viables entre ambos grupos.

#### 1-(4) Evaluación de las células apoptóticas

De la misma manera que 1-(3), se recogieron las microesferas 48 h, 7, 14 y 28 d después del inicio del cultivo, se lavaron dos veces con PBS para recoger las células lavadas y se marcaron  $3,6 \times 10^5$  células con kit de detección de apoptosis II con isotiocianato de fluoresceína y anexina V (FITC) (BD Biosciences, San Jose, CA, USA) para contar las células apoptóticas con un citómetro de flujo (FACS Cant; BD biosciences, CA, USA). FITC+/PI- representaba las células apoptóticas tempranas, FITC+/PI+ representaba las células apoptóticas tardías, y en conjunto representaban las células apoptóticas. La proporción de células viables respecto al total de células y la proporción de células apoptóticas respecto al total de células se evaluaron utilizando FITC-/PI- como células viables. En cada punto temporal de recogida de células, n fue de 5 (n = 5).

Como resultado, los porcentajes de células viables y las proporciones de células apoptóticas en el Grupo A (alginato de sodio de baja endotoxina) y el Grupo B (alginato de sodio de calidad alimentaria) fueron de aproximadamente 90% y aproximadamente 10%, respectivamente, en cada punto temporal, es decir, 48 h, 7, 14 y 28 d después del inicio del cultivo, y no se encontraron diferencias entre ambos grupos.

1-(5) Evaluación de las células privadas de suero

Dado que el área dentro de un disco intervertebral humano es avascular y se encuentra en un entorno de baja nutrición, se realizaron pruebas de cultivo celular asumiendo el entorno dentro de un disco intervertebral bajo inanición de suero para las evaluaciones.

Las microesferas se recogieron el Día 7 del cultivo 3D en 1-(2) y se lavaron dos veces con PBS. Las microesferas se añadieron a un medio DMEM sin suero, 1% de penicilina/estreptomicina y 1,25 µg/ml de fungizona, y se incubaron en condiciones de 37 °C, 5% de CO<sub>2</sub> y 20% de O<sub>2</sub> para inducir la inanición de suero. Las células se recogieron 6 y 48 h después del inicio de la inanición de suero. De la misma manera que se ha descrito anteriormente, se realizaron evaluaciones con un microscopio láser confocal y evaluaciones con un citómetro de flujo.

Como resultado, en las evaluaciones realizadas con un microscopio láser confocal en condiciones de privación de suero, no se observaron diferencias significativas en los porcentajes de células viables entre el Grupo A (alginato sódico de baja endotoxina) y el Grupo B (alginato sódico de calidad alimentaria) a las 6 y a las 48 h, pero el porcentaje de células viables tendió a ser mayor para el Grupo A (alginato sódico de baja endotoxina) que para el Grupo B (alginato sódico de calidad alimentaria) después de 48 h.

En las evaluaciones realizadas con un citómetro de flujo, no se observaron diferencias entre ambos grupos en las muestras después de 6 h, pero el porcentaje de células viables fue significativamente mayor y el porcentaje de células apoptóticas fue significativamente menor en el Grupo A (alginato sódico de baja endotoxina) que en el Grupo B (alginato sódico de calidad alimentaria) después de 48 h (Figuras 1 y 2).

La inducción de la inanición de suero en este ensayo supone el entorno de un núcleo pulposo humano de un disco intervertebral, es decir, una zona avascular en un entorno de baja nutrición. Se sugirió que el cultivo de las células del núcleo pulposo utilizando un alginato de sodio de baja endotoxina era muy resistente a la apoptosis inducida por la inanición de suero, en comparación con el caso en que se utilizó un alginato de sodio de calidad alimentaria. Específicamente, en comparación con el alginato de sodio de grado alimentario, se sugirió que el alginato de sodio de baja endotoxina retiene una proporción de viabilidad celular sin inducir apoptosis de las células del núcleo pulposo cuando se rellena en un sitio del núcleo pulposo de un disco intervertebral.

**Ejemplo 2: Aplicación de una solución de alginato sódico baja en endotoxinas a un modelo de defecto del núcleo pulposo intervertebral de conejo**

Se utilizaron dos tipos de soluciones de alginato sódico de baja endotoxina para rellenar modelos de defectos del núcleo pulposo del disco intervertebral de conejo con el fin de evaluar sus efectos.

2-(1) Preparación del modelo de defecto del núcleo pulposo intervertebral de conejo

Conejos blancos japoneses de 3,2-3,5 kg de peso recibieron anestesia intravenosa con pentobarbital y anestesia local con xilocaína al 1 %, y el tejido del núcleo pulposo del disco intervertebral se succionó con una aguja 18G para preparar un modelo de defecto del núcleo pulposo del disco intervertebral. Se realizó succión en los núcleos pulposos de los discos intervertebrales L2/3 y L4/5 para utilizarlos como modelos de defecto de disco intervertebral y no se realizó succión en L3/4 para utilizarlo como disco intervertebral normal (grupo de control normal).

2-(2) Relleno con solución de alginato sódico de baja endotoxina

Se utilizaron los dos tipos siguientes de alginatos de sodio de baja endotoxina. Ambos presentaban contenidos de endotoxinas inferiores a 50 EU/g. La viscosidad aparente y el peso molecular medio ponderal de cada uno de los alginatos sódicos de baja endotoxina son los que se muestran en la Tabla 2. La medición de la viscosidad aparente de un alginato de sodio se llevó a cabo empleando un procedimiento de viscosímetro rotacional (viscosímetro rotacional de placa cónica) de acuerdo con el procedimiento de medición de la viscosidad de la Farmacopea Japonesa (16ª edición). Las condiciones específicas de medición fueron las siguientes. Las soluciones de las muestras se prepararon con agua MilliQ. Como instrumento de medición, un viscosímetro rotacional de placa cónica (dispositivo de medición de viscosidad/viscoelasticidad RheoStress RS600 (Thermo Haake GmbH) sensor: 35/1). Las velocidades de rotación fueron de 1 rpm para medir una solución de alginato de sodio al 1 p/p%, y de 0,5 rpm para medir una solución de alginato de sodio al 2 p/p%. Los tiempos de lectura fueron de 2 min de medición para la solución al 1 p/p% para obtener un valor promedio entre 1 a 2 min después del inicio de la medición, y de 2,5 min de medición para la solución al 2 p/p% para obtener un valor promedio entre 0,5 a 2,5 min después del inicio de la medición. Como valor medido se utilizó el valor medio de tres mediciones. La temperatura para las mediciones fue de 20 °C.

El peso molecular promedio ponderal de cada uno de los alginatos de sodio se midió mediante dos tipos de mediciones, es decir, cromatografía de permeación en gel (GPC) y GPC-MALS. Las condiciones de medición fueron las siguientes.

[Procedimiento de pretratamiento]

La muestra se añadió con un eluyente a disolver y se filtró a través de un filtro de membrana de 0,45 µm para obtener una solución de medida

(1) Medición por cromatografía de permeación en gel (GPC)

[Condiciones de medición (medición de la distribución del peso molecular relativo)]

5 Columnas: TSKgel GMPW-XL × 2 + G2500PW-XL (7,8 mm D.I. × 300 mm × 3 columnas)  
 Eluyente: solución acuosa de nitrato sódico 200 mM  
 Caudal: 1,0 ml/min  
 Concentración: 0,05%  
 Detector: Detector RI  
 10 Temperatura de la columna: 40 °C  
 Cantidad inyectada: 200 µl  
 Estándar de peso molecular: Pullulan estándar, glucosa

(2) Medición GPC-MALS

15 [Medición del incremento del índice de refracción (dn/dc) (condiciones de medición)]

Refractómetro diferencial: Optilab T-rEX  
 Longitud de onda de medición: 658 nm  
 20 Temperatura de medición: 40 °C  
 Disolvente: solución acuosa de nitrato sódico 200 mM  
 Concentraciones de muestras: 0,5 a 2,5 mg/ml (5 concentraciones)

[Condiciones de medición (medición de la distribución absoluta del peso molecular)]

25 Columnas: TSKgel GMPW-XL × 2 + G2500PW-XL (7,8 mm D.I. × 300 mm × 3 columnas)  
 Eluyente: solución acuosa de nitrato sódico 200 mM  
 Caudal: 1,0 ml/min  
 Concentración: 0,05%  
 30 Detector: Detector RI, detector de dispersión de luz (MALS)  
 Temperatura de la columna: 40 °C  
 Cantidad inyectada: 200 µl

[Tabla 2]

	Viscosidad aparente (mPa·s)		peso molecular promedio ponderado		proporción M/G
	1 p/p%	2 p/p%	GPC	GPC-MALS	
A-1	50-150	500-1200	700.000-1.000.000	100.000-200.000	0,6-1,8
A-2	300-600	3000-6000	1.100.000-1.700.000	200.000-400.000	

35 Cada uno de los alginatos de sodio de baja endotoxina se disolvió en agua Milli-Q para preparar una solución al 2 p/v%.  
 Se insertó una aguja desde el lado del disco intervertebral hacia el núcleo pulposo para inyectar 20 µl de la solución de  
 alginato de sodio con bajo contenido en endotoxina en la parte defectuosa del núcleo pulposo. Se aplicó una solución  
 40 acuosa de cloruro cálcico 102 mM durante varios segundos en el lado del disco intervertebral en donde se había extraído  
 la aguja (denominados Grupos A-1 y A-2, respectivamente, y denominados colectivamente grupos de tratamiento).

El grupo que sólo recibió succión del núcleo pulposo se denominó grupo de sólo succión.

45 Los animales fueron eutanasiados por llenado excesivo de pentobarbital cuatro semanas después de la cirugía para sacar  
 la vértebra lumbar y recoger los tejidos del disco intervertebral. El Grupo A-2 también se evaluó doce semanas después  
 de la cirugía. Se realizaron 8 ejemplos por grupo.

2-(3) Evaluación de los tejidos de los discos intervertebrales mediante IRM, clasificación de Pfirrmann

50 Se tomó una imagen sagital ponderada en T2 del disco intervertebral con un escáner de IRM de 7,0 Tesla (Unity Inova,  
 Varian). Los cambios debidos a la degeneración del disco intervertebral pueden confirmarse con la imagen de IRM  
 ponderada en T2 del disco intervertebral. Para evaluar la gravedad de la degeneración del disco intervertebral se utilizó  
 la clasificación de Pfirrmann. Esta clasificación es un sistema de graduación para evaluar la degeneración de los discos  
 intervertebrales en la IRM mediante cinco grados (grado 1: normal a grado 5: muy degenerado). Los criterios para evaluar  
 55 la degeneración del disco intervertebral se muestran en la Tabla 3 (Spine (Phila Pa 1976). 2001;26(17) 1873-8).

[Tabla 3]

Grado	Estructura	Distinción entre núcleo pulposo y anillo fibroso	Intensidad de la señal	Altura del disco intervertebral
1	Homogéneo, blanco brillante	Claro	Hiperintenso, isointenso al líquido cefalorraquídeo	Normal
2	Inhomogéneo con o sin bandas horizontales	Claro	Hiperintenso, isointenso al líquido cefalorraquídeo	Normal
3	Inhomogéneo, gris	Poco claro	Intermedio	Normal a ligeramente disminuido
4	Inhomogéneo, gris a negro	Perdido	Intermedio hipointenso	Normal a moderadamente disminuido
5	Inhomogéneo, negro	Perdido	Hipointenso	Espacio discal intervertebral colapsado

5 Como resultado, de acuerdo con la clasificación de Pfirrmann para puntuar la gravedad de la degeneración del disco intervertebral, el grupo de sólo succión y los grupos de tratamiento (Grupos A-1 y A-2) tenían puntuaciones significativamente más altas que el grupo de control normal cuatro semanas después de la cirugía, lo que indica degeneración del disco intervertebral. Además, el grupo A-1 presentó una puntuación significativamente inferior a la del grupo de sólo succión, lo que indica una supresión de la degeneración. Aunque no hubo diferencias significativas en las puntuaciones entre el Grupo A-2 y el grupo de sólo aspiración, el Grupo A-2 mostró una tendencia a tener puntuaciones más bajas que el grupo de sólo aspiración (Figura 3).

10 De acuerdo con las evaluaciones del Grupo A-2 doce semanas después de la cirugía, las puntuaciones del Grupo A-2 fueron significativamente más bajas que las del grupo de sólo succión.

#### 2-(4) Evaluación del tejido del disco intervertebral mediante el índice de IRM

15 Se utilizó el software Analyze 10.0 (AnalyzeDirect, Overland Park, KS, EE. UU.) para medir el índice sagital de IRM (el producto de la intensidad media de la señal y el área del núcleo pulposo) para la evaluación cuantitativa. La evaluación se realizó basándose en la proporción del índice de IRM de cada grupo con respecto al índice de IRM del disco intervertebral del grupo de control normal como 100 (véase Spine (Phila Pa 1976). 1 de enero de 2005;30(1):15-24).

20 Como resultado, los índices de resonancia magnética de los grupos de tratamiento (Grupos A-1 y A-2) fue significativamente mayor que la del grupo de sólo succión cuatro semanas después de la cirugía, lo que indica la supresión del cambio degenerativo (Figura 4). La evaluación del Grupo A-2 doce semanas después de la intervención también mostró que el índice de IRM del Grupo A-2 era significativamente superior al del grupo de sólo succión.

#### 25 2-(5) Evaluación histológica

30 Tras la obtención de imágenes de IRM, se prepararon especímenes de tejido de los discos intervertebrales. Se fijó una muestra con formaldehído al 10%, se descalcificó con EDTA al 10% (pH7,5) y se incrustó en parafina. Una sección sagital de parafina de 5 µm de grosor se desparafinó con xileno, se trató con alcohol, se lavó con agua y, a continuación, se sometió a tinción HE y tinción con safranina-O. Clasificación de los cambios degenerativos en el anillo fibroso por Nishimura et al. (Spine (Phila Pa 1976). 1998;23(14):1531-8) se utilizó para puntuar el grado de degeneración en todo el tejido del disco intervertebral. La clasificación de Nishimura et al. es la siguiente.

35 Grado 1: Leve serpentina con ruptura  
Grado 2: Moderadamente serpenteante con ruptura  
Grado 3: Serpentina severa con contorno ligeramente invertido  
Grado 4: Contorno severamente invertido  
Grado 5: Indistinto

40 Como resultado de la evaluación histológica de la gravedad de la degeneración del disco intervertebral, el grupo de sólo succión y los grupos de tratamiento (Grupos A-1 y A-2) mostraron puntuaciones significativamente más altas que las del grupo de control normal cuatro semanas después de la cirugía de acuerdo con la clasificación de Nishimura et al., lo que indica degeneración. Sin embargo, los grupos de tratamiento (Grupos A-1 y A-2) mostraron puntuaciones significativamente inferiores a las del grupo de sólo succión, lo que indica supresión de la degeneración (Figura 5).

45 La evaluación para el Grupo A-2 doce semanas después de la cirugía también mostró que el Grupo A-2 puntuó

significativamente más bajo que el grupo de sólo succión. Se muestran imágenes de los especímenes de tejido del grupo de control normal, del grupo de sólo aspiración y del Grupo A-2 cuatro y doce semanas después de la cirugía (Figura 6).

#### 2-(6) Evaluación inmunohistológica

Los especímenes de tejido preparados en 2-(5) se sometieron a tinción inmunohistológica utilizando anticuerpos contra el colágeno de tipo I y anticuerpos contra el colágeno de tipo II para contar el número de células positivas en cinco campos de visión del núcleo pulposo del disco intervertebral seleccionados al azar.

Como resultado, no hubo diferencia en la proporción de células positivas al anticuerpo anti-Tipo I de colágeno a los números de células en las secciones cuatro semanas después de la cirugía entre el grupo de control normal, el grupo de solo succión y los grupos de tratamiento (Grupos A-1 y A-2).

Por otra parte, las proporciones de células positivas al anticuerpo contra el colágeno de tipo II tanto en el grupo de aspiración como en los grupos de tratamiento (Grupos A-1 y A-2) cuatro semanas después de la cirugía fueron significativamente inferiores a las del grupo de control normal, lo que indica que la producción de matriz extracelular observada en un tejido de disco intervertebral normal disminuyó. Sin embargo, las proporciones de células positivas a los anticuerpos anti-Tipo II del colágeno de los grupos de tratamiento (Grupos A-1 y A-2) fueron significativamente superiores a las del grupo de sólo succión.

De acuerdo con la evaluación para el Grupo A-2 doce semanas después de la cirugía, las proporciones de las células positivas al anticuerpo anti-Tipo II de colágeno del Grupo A-2 fueron significativamente más altas que las del grupo de sólo succión y se demostró que no había diferencia con las del grupo de control normal. En la Figura 7 se muestran gráficos de las proporciones de células positivas para anticuerpos anticolágeno tipo II con respecto al número de células en las secciones de tejido del núcleo pulposo de los discos intervertebrales cuatro y doce semanas después de la cirugía para el grupo de control normal, el grupo de sólo succión y el Grupo A-2. Las células positivas para anticuerpos de colágeno tipo II representan la presencia de células similares al cartílago hialino. Se demostró que la proporción de células similares al cartílago hialino en el núcleo pulposo del disco intervertebral de conejo se recuperaba hasta un nivel comparable al del grupo de control normal doce semanas después de la cirugía utilizando la solución de alginato de sodio con bajo contenido en endotoxinas.

En consecuencia, se descubrió que la solución de alginato de sodio con bajo contenido de endotoxina suprimía los cambios degenerativos y promovía la regeneración de todo el tejido del disco intervertebral y del núcleo pulposo al rellenarse en la parte defectuosa del núcleo pulposo. Además, los alginatos sódicos de baja endotoxina A-1 y A-2 mostraron efectos de supresión de la degeneración y regeneración del disco intervertebral en grados similares.

En términos de propiedad de manipulación, la solución al 2% de A-2 que tenía una viscosidad más alta que la de la solución al 2% de A-1 era ventajosa en el sentido de que era más improbable que fluyera hacia atrás del sitio rellenado cuando se rellenaba en el sitio del núcleo pulposo y en el sentido de que podía distinguirse fácilmente del fluido corporal. La solución al 2% de A-2 presentaba una viscosidad adecuada para el llenado y, por tanto, una excelente propiedad de manipulación.

#### **Ejemplo 3: Examen del procedimiento de inyección de una solución de alginato de sodio con bajo contenido en endotoxinas**

##### 3-(1) Examen del procedimiento de inyección de una solución de alginato de sodio con bajo contenido en endotoxinas

Se emplearon los siguientes dos tipos de procedimientos de inyección (i) y (ii) para inyectar una solución de alginato de sodio de baja endotoxina en una vértebra lumbar de un cadáver de oveja para evaluaciones.

(i) Un procedimiento en donde la solución de alginato de sodio al 2 % de baja endotoxina de A-2 descrita en el Ejemplo 2 se inyecta en un sitio de núcleo pulposo parcialmente resecado de un disco intervertebral, y a continuación se pone en contacto una solución de cloruro de calcio 100 mM cerca del orificio de la aguja en la superficie del disco intervertebral (una parte del alginato de sodio que entra en contacto con la solución de cloruro de calcio se cura), de acuerdo con la descripción del Ejemplo 2. (ii) Un procedimiento en donde se utilizan simultáneamente la solución de alginato sódico al 2 % con bajo contenido en endotoxinas de A-2 y una solución de cloruro cálcico 100 mM: 1 para rellenar el sitio del núcleo pulposo parcialmente resecado del disco intervertebral (se cura todo el alginato de sodio inyectado en el sitio del núcleo pulposo). El procedimiento (ii) se llevó a cabo colocando la solución de alginato sódico de baja endotoxina y la solución de cloruro cálcico en jeringas separadas y, a continuación, inyectándolas simultáneamente en el lugar defectuoso del núcleo pulposo del disco intervertebral con una aguja 22G.

Como resultado, no hubo dificultad en la manipulación de la inyección cuando se realizó el procedimiento (i) para el disco intervertebral del cadáver de oveja. Mientras tanto, el procedimiento (ii) parecía tener una baja reproducibilidad con respecto al mantenimiento de una proporción de mezcla constante de la solución de alginato de sodio de baja endotoxina y la solución de cloruro de calcio. Además, cuando se produce una gelificación parcial durante la obturación, cabe preguntarse si el gel puede rellenar la cavidad restante sin dejar un espacio. Además, cuando se aplicó una fuerza de

compresión al disco intervertebral desde los lados de la cabeza y la cola después de que el gel de curado rellenara el lugar del núcleo pulposo del disco intervertebral mediante el procedimiento ii), se observó un fenómeno en donde el gel curado se desviaba del orificio para inyectar el gel en el lado del disco intervertebral. No se observó desviación del disco intervertebral con el procedimiento (i).

El procedimiento (i) puede reducir la concentración de calcio en el disco intervertebral en comparación con el procedimiento (ii), y tiene el mérito de aliviar la citotoxicidad. Además, mientras que el procedimiento (ii) tiene un riesgo en donde el curegel puede sobresalir en el canal espinal y causar una neuropatía grave, el procedimiento (i) tiene un riesgo menor.

Por consiguiente, el procedimiento (i), es decir, un procedimiento en donde se inyecta una solución de alginato de sodio de baja endotoxina en el núcleo pulposo del disco intervertebral y, a continuación, se aplica una solución de cloruro de calcio a la superficie del disco intervertebral, parece ser un procedimiento adecuado para rellenar el núcleo pulposo con alginato de sodio de baja endotoxina.

### 3-(2) Prueba mecánica con cadáver de oveja

Al disco intervertebral de un cadáver de oveja preparado por el procedimiento (i) en 3-(1) (que se obtuvo inyectando la solución de alginato de sodio de baja endotoxina al 2 % de A-2 en el sitio del núcleo pulposo parcialmente ressecado del disco intervertebral y luego poniendo en contacto la solución de cloruro de calcio 100 mM alrededor del orificio de la aguja en la superficie del disco intervertebral), se utilizó Instron 5943 (Instron), una hora después del llenado, para aplicar fuerza de compresión y fuerza de estiramiento al disco intervertebral desde los lados de la cabeza y la cola repetidamente durante 1000 veces con una fuerza axial de compresión/estiramiento de -300 N a 300 N para observar si había alguna desviación del orificio utilizado para inyectar la solución de alginato de sodio. Para mejorar la visibilidad, se utilizó una solución de alginato de sodio coloreada con azul de toluidina al 0,05%.

Como resultado, no se observó desviación de la solución de alginato de sodio del disco intervertebral a través de la abertura de inyección. Por lo tanto, el procedimiento de inyectar una solución de alginato de sodio en el núcleo pulposo del disco intervertebral y posteriormente curar alrededor de la abertura de inyección en la superficie del disco intervertebral con un agente reticulante se sugirió como un procedimiento de llenado que puede soportar la fuerza de compresión y la fuerza de estiramiento en el disco intervertebral causada por el cambio en la postura, o caminar, después del llenado con la solución de alginato de sodio.

### **Ejemplo 4: Examen de las propiedades tras la inyección de una solución de alginato de sodio con bajo contenido en endotoxinas**

Se realizaron los siguientes exámenes *in vitro* para predecir las propiedades de la solución de alginato de sodio de baja endotoxina inyectada en el núcleo pulposo del disco intervertebral cuando se inyectaba una solución de alginato de sodio de baja endotoxina en el núcleo pulposo del disco intervertebral y, a continuación, se ponía en contacto una solución de cloruro de calcio alrededor de la abertura de inyección de la solución de alginato de sodio inyectada en la superficie del disco intervertebral para curar el sitio de contacto.

#### 4-(1) Procedimiento de ensayo

Las soluciones de alginato de sodio se colocaron en los respectivos microtubos de ensayo (diámetro 6 mm, altura 25 mm) mediante los tres procedimientos siguientes X, Y y Z, y los tubos de ensayo se colocaron en reposo. 1, 24, 48 h y 1 semana después, se evaluaron las propiedades de las sustancias de ensayo en los tubos de ensayo. Dado que se practicó una incisión de 5 mm × 3 mm en el anillo fibroso para ressecar el núcleo pulposo en el modelo de nucleotomía intervertebral ovina del ejemplo 5, se seleccionó un microtubo de ensayo con un diámetro de 6 mm como tamaño relativamente próximo al de este ensayo *in vivo* y que permitía realizar operaciones en el interior del tubo de ensayo. El alginato de sodio de baja endotoxina de A-2 del Ejemplo 2 se disolvió con solución salina fisiológica para utilizarse como una solución al 2 p/v%. La prueba se realizó a temperatura ambiente, es decir, a 20 °C.

[Tabla 4]

	Procedimientos
X	se colocaron 500 µl de una solución de alginato sódico al 2 p/v% en un tubo de ensayo, se dejaron caer 50 µl de una solución de cloruro cálcico 100 mM sobre la superficie de la solución de alginato sódico y se dejó reposar el resultado durante 5 min. A continuación, la solución de cloruro cálcico de la superficie se lavó tres veces con solución salina fisiológica.
Y	se colocaron y agitaron en un tubo de ensayo 200 µl cada uno de una solución de alginato de sodio al 2 p/v% y una solución de cloruro de calcio 25 mM.
Z	se colocaron y agitaron en un tubo de ensayo 200 µl cada uno de una solución de alginato de sodio al 2 p/v% y una solución de cloruro de calcio 100 mM.

#### 4-(2) Resultados

La solución de alginato de sodio al 2 p/v% utilizada para la prueba tenía mayor viscosidad que la solución salina fisiológica, por lo que la superficie del líquido se movía lentamente cuando se inclinaba el vial y la solución podía succionarse con una jeringa con aguja 21G tomándose su tiempo.

Las propiedades del grupo X fueron generalmente las mismas desde 1 h después hasta 1 semana después. Concretamente, mientras que aproximadamente 2-3 mm de la superficie de la solución de alginato sódico en el tubo de ensayo tenían aspecto de gel, no se observó solidificación y la solución estaba en estado de sol en la zona distinta de la superficie. Aunque la mayor parte de la parte en estado sol pudo succionarse utilizando una jeringa con una aguja 21G, tardó más tiempo en succionarse que la solución de alginato sódico al 2 p/v% debido a su mayor viscosidad.

Las propiedades del grupo Y fueron generalmente las mismas desde 1 h después hasta 1 semana después. Concretamente, la mayor parte de la solución en el tubo de ensayo gelificaba como gelatina con una pequeña parte líquida similar al agua. Se supuso que se trataba de un fenómeno de "sinéresis" en donde el gel se contrae para separarse y exudar líquido. La parte gelificada no pudo succionarse utilizando una jeringa con aguja 21G.

Las propiedades del grupo Z fueron generalmente las mismas desde 1 h después hasta 1 semana después. Concretamente, se formó una masa gelificada turbia de color blanco con un diámetro de aproximadamente 5 mm, siendo la parte restante líquida similar al agua. También se supuso que se trataba de un fenómeno de "sinéresis". La parte gelificada no pudo succionarse utilizando una jeringa con aguja 21G.

El procedimiento del grupo X se parecía al procedimiento de inyección en un núcleo pulposo de un disco intervertebral en los ejemplos de la presente invención, y se suponía que una solución de alginato de sodio existía en estado sol cuando se inyectaba en un núcleo pulposo del disco intervertebral. Mientras tanto, se encontraban en estado gel en ambos grupos Y y Z, y por lo tanto existía la preocupación de que el gel curado pudiera desviarse del lado del disco intervertebral inyectado con el gel cuando se aplicaba la fuerza de compresión desde los lados de la cabeza y la cola, después de llenar el núcleo pulposo del disco intervertebral con el gel, como se confirmó en el Ejemplo 3 de la presente invención.

#### **Ejemplo 5: Aplicación de una solución de alginato sódico con bajo contenido en endotoxinas a un modelo de defecto del núcleo pulposo del disco intervertebral ovino**

Se rellenó un modelo de defecto del núcleo pulposo de un disco intervertebral de oveja con una solución de alginato sódico de baja endotoxina para evaluar el efecto. Se utilizaron discos intervertebrales L1/2, L2/3, L3/4 y L4/5 de siete ovejas (macho, Suffolk) de 40 kg-60 kg de peso para realizar las siguientes evaluaciones.

#### **5-(1) Preparación de modelos de disco intervertebral de oveja con defecto del núcleo pulposo**

Se anestesiaron ovejas y se expusieron los discos intervertebrales con un bisturí eléctrico. Se practicó una incisión en el anillo fibroso de cada disco intervertebral y se extrajo 5 mm × 3 mm. Se introdujeron pinzas en ese orificio para extraer 0,10 g de núcleo pulposo para preparar un modelo de defecto de núcleo pulposo de disco intervertebral. Aquí, el tamaño de la incisión del anillo fibroso y la cantidad de núcleo pulposo extirpado se determinaron realizando previamente una prueba de degeneración del disco intervertebral mediante una nucleotomía intervertebral ovina. Se investigó el tamaño incisivo del anillo fibroso para 5 mm × 3 mm y 10 mm × 3 mm, y se seleccionó 5 mm × 3 mm que mostraba el progreso de la degeneración del disco intervertebral en función de los volúmenes del núcleo pulposo extirpado. Se examinaron cuatro volúmenes de núcleo pulposo ressecado, es decir, 0,02 g, 0,05 g, 0,1 g y 0,2 g. Un volumen ressecado de 0,1 g para un núcleo pulposo de oveja corresponde a 1,2 g en un humano, que es lo más parecido al volumen ressecado del núcleo pulposo en la práctica clínica humana. Así pues, se seleccionó un volumen de núcleo pulposo ressecado de 0,1 g.

#### **5-(2) Relleno de solución de alginato de sodio con bajo contenido en endotoxinas**

El alginato de sodio de baja endotoxina de A-2 del Ejemplo 2 se preparó en una solución al 2w/v% con agua Milli-Q, y 0,10 ml del resultante se inyectaron en la parte defectuosa del núcleo pulposo del disco intervertebral de oveja preparado en 5-(1) con una jeringa. Se aplicó una solución acuosa de cloruro cálcico 102 mM a la superficie de la solución de alginato sódico inyectada durante varios segundos. Tras dejarla durante aproximadamente 5 min, la parte aplicada con la solución de cloruro cálcico se lavó con suero fisiológico y se suturó. Se agruparon como grupo de tratamiento (n = 11). Además, los que sólo recibieron la nucleotomía intervertebral en 5-(1) y se suturaron se agruparon como grupo de nucleotomía (n = 10). Los discos intervertebrales ovinos no tratados se agruparon como grupo de control normal (n = 7).

Los animales fueron eutanasiados mediante la administración excesiva de pentobarbital cuatro semanas después de la cirugía para extraer las vértebras lumbares y recoger los tejidos del disco intervertebral.

#### **5-(3) Evaluación histológica**

La tinción HE y la tinción con safranina O se realizaron de acuerdo con la descripción en 2-(5) anterior para preparar especímenes de tejido de los discos intervertebrales. Clasificación modificada basada en la clasificación de Boos (Eur

Spine J. 2014 Jan; 23(1):19-26. Spine 2002 Vol.27, No.23 p.2631-2644) para evaluar los grados de degeneración del disco intervertebral. La clasificación se muestra en la Tabla 5. El punto máximo de los ítems para un disco intervertebral fue de 20, mientras que el punto máximo de los ítems para una placa terminal de cuerpo vertebral fue de 16, y la evaluación se realizó con el punto total de 36 como máximo.

5

[Tabla 5]

Disco intervertebral (Máximo de 20 puntos)	Placa terminal del cuerpo vertebral (Máximo 16 puntos)
Células (proliferación de condrocitos) 0 = Sin proliferación 1 = Aumento de la densidad celular 2 = Conexión de dos condrocitos 3 = Clones de pequeño tamaño (3-7 células) 4 = Clones de tamaño moderado (8-15 células) 5 = Clones enormes (16 células o más)	Número de células acinosas 0 = Ausente 1 = Rara vez presente 2 = Presente en cantidades intermedias 3 = Presencia abundante
Cambios en los gránulos acidófilos indefinidos 0 = Ausente 1 = Rara vez presente 2 = Presente en cantidades intermedias 3 = Presencia abundante	Desorganización de la estructura del cartílago 0 = Ausente 1 = Rara vez presente 2 = Presente en cantidades intermedias 3 = Presencia abundante
Neovascularización 0 = Ausente 1 = Presente	Grietas en el cartílago 0 = Ausente 1 = Rara vez presente 2 = Presente en cantidades intermedias 3 = Presencia abundante
Fisuras del anillo fibroso (microfisuras en los bordes) 0 = Ausente 1 = Rara vez presente 2 = Presente en cantidades intermedias 3 = Presencia abundante	Microfractura 0 = Ausente 1 = Rara vez presente 2 = Presente en cantidades intermedias 3 = Presencia abundante
Fisuras del anillo fibroso (fisuras concéntricas) 0 = Ausente 1 = Rara vez presente 2 = Presente en cantidades intermedias 3 = Presencia abundante	Neovascularización 0 = Ausente 1 = Presente
Desgarros del anillo fibroso 0 = Ausente 1 = Rara vez presente 2 = Presente en cantidades intermedias 3 = Presencia abundante	Formación de hueso nuevo 0 = Ausente 1 = Presente
Formación de cicatrices 0 = Ausente 1 = Presente	Formación de cicatrices 0 = Ausente 1 = Presente
Defectos tisulares 0 = Ausente 1 = Presente	Defectos tisulares 0 = Ausente 1 = Presente

Los resultados de la evaluación histológica de la gravedad de la degeneración del disco intervertebral mostraron que las puntuaciones del grupo de nucleotomía y del grupo de tratamiento cuatro semanas después de la cirugía eran significativamente superiores a las del grupo de control normal de acuerdo con la clasificación mostrada en la Tabla 5, lo

10

que sugiere degeneración. Sin embargo, la puntuación del grupo de tratamiento fue significativamente inferior a la del grupo de nucleotomía, lo que demuestra la supresión de la degeneración (Figura 8).

Además, las alturas de los discos intervertebrales se evaluaron mediante el índice de altura del disco (DHI). Un índice de altura del disco es un valor que se obtiene dividiendo la altura del disco intervertebral (un promedio de las alturas anterior, media y posterior del disco intervertebral) por el diámetro anteroposterior del disco intervertebral (Eur Spine J. 2014, 23(1):19-26).

Como resultado, el índice de altura del disco del grupo de nucleotomía disminuyó significativamente en comparación con el del grupo de control normal. Mientras tanto, no hubo diferencias significativas en el índice de altura del disco entre el grupo de tratamiento y el grupo de control normal. En consecuencia, se observó que el relleno del núcleo pulposo con una solución de alginato de sodio con bajo contenido en endotoxinas suprimía la disminución de la altura del disco intervertebral causada por la resección del núcleo pulposo (Figura 9).

#### 5-(4) Evaluación inmunohistológica

Los especímenes de tejido preparados en el punto 5-(3) anterior se sometieron a tinción inmunohistológica utilizando anticuerpos contra el colágeno de tipo I y anticuerpos contra el colágeno de tipo II para contar el número de células positivas en cinco campos de visión del núcleo pulposo del disco intervertebral seleccionados aleatoriamente.

Como resultado, las proporciones de las células positivas al anticuerpo contra el colágeno de tipo I con respecto al número de células en las secciones cuatro semanas después de la cirugía fueron significativamente mayores para el grupo de nucleotomía y el grupo de tratamiento, mientras que fue del 10 % o inferior para el grupo de control normal. Sin embargo, la proporción de células positivas a los anticuerpos contra el colágeno de tipo I fue significativamente inferior en el grupo de tratamiento que en el grupo de nucleotomía.

Las proporciones de las células positivas al anticuerpo contra el colágeno de tipo II con respecto al número de células en las secciones cuatro semanas después de la cirugía fueron de aproximadamente el 60% para el grupo de control normal y el grupo de tratamiento, sin mostrar diferencias. Mientras tanto, el grupo de nucleotomía dio alrededor del 40%, lo que fue significativamente diferente del grupo de control normal y del grupo de tratamiento (Figura 10). Aunque la proporción de células positivas a los anticuerpos contra el colágeno de tipo II obtenida con la escisión del núcleo pulposo sola fue inferior a la obtenida para el grupo normal, se comprobó que se recuperaba a un nivel comparativo con el grupo de control normal cuatro semanas después de la cirugía mediante el llenado de una solución de alginato de sodio con bajo contenido en endotoxinas.

A partir de los resultados descritos anteriormente, se demostró que la aplicación de la solución de alginato de sodio de baja endotoxina al núcleo pulposo suprime la degeneración y promueve la regeneración del núcleo pulposo del disco intervertebral. Junto con los resultados de la prueba dinámica del Ejemplo 3, la composición de la presente invención se encontró favorable para utilizarse particularmente para rellenar un núcleo pulposo después de una nucleotomía intervertebral. Además, la disminución del índice de altura del disco debida a la resección del núcleo pulposo se suprimió en el grupo de tratamiento, lo que sugiere la posibilidad de prevenir y/o aliviar también la degeneración de un disco intervertebral adyacente al disco intervertebral tratado.

#### **Ejemplo 6: Examen de la composición del núcleo pulposo del disco intervertebral ovino**

La matriz extracelular de un núcleo pulposo de un disco intervertebral se compone principalmente de agua, colágeno de tipo II y proteoglicano, y se dice que tiene una mayor proporción de proteoglicano con respecto al colágeno en comparación con otros tejidos cartilagosos tal como las placas terminales de los discos intervertebrales y un cartílago articular. Existe un documento que describe esta proporción entre proteoglicanos y colágeno como una proporción entre glicosaminoglicanos sulfatados (GAG) e hidroxiprolina (HYP) (European Cells and Materials Vol.8. 2004 p.58-64). Se rellenó un modelo de defecto del núcleo pulposo de disco intervertebral de oveja con una solución de alginato de sodio con bajo contenido en endotoxinas, y se evaluó mediante un análisis bioquímico del tejido del núcleo pulposo cuatro semanas después de la cirugía, de acuerdo con el documento mencionado anteriormente.

#### 6-(1) Procedimiento

Para la prueba se utilizaron discos intervertebrales L1/2, L2/3, L3/4 y L4/5 de dos ovejas (macho, Suffolk) de 35 kg-60 kg de peso. Se prepararon modelos de defectos del núcleo pulposo del disco intervertebral de oveja de acuerdo con el Ejemplo 5, en donde se introdujo una solución de alginato de sodio al 2 p/v% baja en endotoxina para obtener un grupo de tratamiento (n = 4). Se obtuvo como grupo de nucleotomía (n = 4) un grupo que sólo recibió nucleotomía intervertebral y se suturó de acuerdo con el Ejemplo 5. Se obtuvieron discos intervertebrales ovinos no tratados (T12/L1, L5/6) como grupo de control normal (n = 4). El núcleo pulposo del disco intervertebral y el tejido cartilaginoso (cartílago articular) de los fémures izquierdo y derecho no tratados se recogieron cuatro semanas después de la cirugía para medir el glicosaminoglicano sulfatado (GAG) y la hidroxiprolina (HYP) tras el tratamiento previo de los especímenes.

Los especímenes se pretrataron liofilizando los especímenes, midiendo los pesos secos y añadiendo un tampón HEPES

20 mM (pH7,5) que contenía 1 ml de solución Pronase (Calbiochem) a una concentración de 1 mg/ml a los especímenes secos para digerirlos a 60 °C durante 3 h mientras se agitaba cada 1 h. Los resultantes se centrifugaron a 8.000 x g durante 10 min, y los sobrenadantes resultantes se utilizaron como líquidos madre de muestra para las mediciones. Los líquidos de caldo se refrigeraron hasta las mediciones.

El glicosaminoglicano sulfatado (GAG) se midió utilizando el kit cuantitativo sGAG de Wieslab (marca registrada) (Euro Diagnostica, número de producto: GAG201RUO) de acuerdo con las instrucciones para medir la cantidad de GAG. Los líquidos madre de muestra para las mediciones se diluyeron 100 veces con agua purificada para utilizar las soluciones de dilución resultantes como muestras para la medición. Una muestra en blanco fue una solución de Pronase diluida 100 veces. La longitud de onda de medición fue de 620 nm, y para calcular la cantidad de glicosaminoglicanos en el espécimen se utilizó una curva de calibración preparada a partir del condroitín 6-sulfato (CS-6) como patrón en el kit de medición.

La hidroxiprolina (HYP) se midió de la siguiente manera. Los líquidos madre de las muestras para las mediciones se diluyeron 100 veces con agua purificada a fin de utilizar la solución de dilución resultante como muestras para la medición. Una muestra en blanco fue una solución de Pronase diluida 100 veces. Se recogieron 50 µl de la muestra de medición en un frasco ampolla para hidrólisis, al que se añadió una cantidad equivalente de ácido clorhídrico concentrado y se cerró herméticamente para permitir la hidrólisis a 120 °C durante 16 h. Se prepararon tres muestras de hidrólisis por espécimen. Se recogieron 20 µl de la muestra de hidrólisis y 100 µl de una solución estándar HYP en una placa de pocillos, y se despresurizaron a 40 °C durante 15 h para que se secaran y solidificaran. Se añadieron 100 µl de agua purificada a la muestra seca y se dejó que adquiriera color para medir la absorbancia a 557 nm de acuerdo con el procedimiento de Woessner (Woessner JF Jr, Arch Biochem Biophys, 93,(1961) p.440-447). Dado que las tasas de dilución de las muestras de medición tras la hidrólisis y el desarrollo del color fueron 10 veces, la tasa de dilución total fue de 1000 veces. Se utilizó una curva de calibración preparada a partir de los resultados de la solución estándar de HYP para calcular las cantidades de HYP en los especímenes.

#### 6-(2) Resultados

La cantidad de GAG y la cantidad de HYP (µg/mg de peso seco) de los especímenes en peso seco se obtuvieron para derivar la proporción de GAG a HYP (GAG/HYP). Se determinó un valor promedio y una desviación estándar para cada grupo (n=4) (Tabla 6). Además, en la Figura 11 se muestra un gráfico de dispersión de cada grupo.

[Tabla 6]

	GAG/HYP	
	Valor promedio	Desviación típica
Grupo de nucleotomía (n = 4)	8,9	1,7
Grupo de tratamiento (n = 4)	10,0	2,3
Grupo de control normal (n = 4)	17,8	4,4
Cartílago articular (n = 4)	3,1	0,6

Como resultado, el valor promedio de GAG/HYP del grupo de control normal (núcleo pulposo del disco intervertebral) fue de 17,8, superior al 3,1 del cartílago articular no tratado. Los valores promedio de GAG/HYP del grupo de nucleotomía y de los grupos de tratamiento cuatro semanas después de la cirugía eran inferiores a los del grupo de control normal. El valor promedio de GAG/HYP de los grupos de tratamiento mostró una tendencia a ser ligeramente superior al del grupo de nucleotomía. En consecuencia, el núcleo pulposo del disco intervertebral presentaba una proporción glicosaminoglicano sulfatado (GAG)/hidroxiprolina (HYP) más elevada que el cartílago articular, lo que sugiere que las proporciones de los componentes que constituyen estos tejidos son diferentes, y también que las características tisulares son distintas entre el núcleo pulposo del disco intervertebral y el cartílago articular. Se consideró que la composición para su uso de una sal metálica monovalente de ácido alginico de baja endotoxina de la presente invención tenía posibilidad de recuperar tales características de composición de un núcleo pulposo.

# REIVINDICACIONES

1. Una composición para rellenar el núcleo pulposo de un disco intervertebral que comprende una sal metálica monovalente de ácido alginico de baja endotoxina, que se aplica al núcleo pulposo de un sujeto, que se cura poniendo en contacto un agente reticulante con al menos una parte de la superficie de la composición aplicada, y que tiene fluidez cuando se aplica al núcleo pulposo.
2. La composición para su uso en el relleno de un núcleo pulposo de un disco intervertebral de acuerdo con la reivindicación 1, en donde la composición se aplica al núcleo pulposo a través de una entrada de relleno de la composición en la superficie del disco intervertebral, y se cura poniendo en contacto un agente reticulante con la entrada de relleno de la composición en la superficie del disco intervertebral.
3. La composición para su uso en el relleno de un núcleo pulposo de un disco intervertebral de acuerdo con la reivindicación 1 o 2, en donde la composición se cura parcialmente después de aplicarse al sitio del núcleo pulposo.
4. La composición para su uso en el relleno de un núcleo pulposo de un disco intervertebral de acuerdo con la reivindicación 3, en donde el curado parcial de la composición en el lugar del núcleo pulposo puede determinarse por comparación con un procedimiento *in vitro*, en donde al menos el 50% del volumen de la composición en un tubo de ensayo de 6 mm de diámetro no está gelificado cuando puede succionarse con una jeringa con una aguja 21G, después de llenar el tubo de ensayo con 500 µl de un alginato de sodio de baja endotoxina y un agente reticulante, empleando el mismo procedimiento y proporción para utilizar el agente reticulante que para rellenar el sitio del núcleo pulposo, y dejándolo reposar durante una hora.
5. La composición para su uso en el relleno de un núcleo pulposo de un disco intervertebral de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-4, en donde la composición se va a aplicar al sitio del núcleo pulposo aplicando la composición a un sitio defectuoso del núcleo pulposo formado mediante la eliminación de al menos una parte del núcleo pulposo.
6. La composición para su uso en el relleno de un núcleo pulposo de un disco intervertebral de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-5, en donde la viscosidad aparente de la composición que tiene fluidez es de 500 mPa·s a 10.000 mPa·s medida en una solución al 2% con un viscosímetro de placa cónica bajo una condición en donde la temperatura de medición es de 20 °C, la velocidad de rotación es de 0,5 rpm, y el tiempo de lectura es de 2,5 min de medición para obtener el promedio de los valores tomados durante el período comprendido entre 0,5 y 2,5 min después del inicio de la medición como viscosidad aparente.
7. La composición para su uso en el relleno de un núcleo pulposo de un disco intervertebral de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-6, en donde
  - (i) el peso molecular promedio ponderado (peso molecular absoluto) de una sal metálica monovalente de ácido alginico de baja endotoxina es igual o superior a 80.000, medido por un procedimiento GPC-MALS; y/o
  - (ii) la concentración de una sal metálica monovalente de ácido alginico de baja endotoxina es de 0,5 p/p% a 5 p/p%.
8. La composición para su uso en el relleno de un núcleo pulposo de un disco intervertebral de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-7, en donde
  - (i) la composición no contiene el agente reticulante en una cantidad que permita el curado de la composición antes de aplicarse al núcleo pulposo del sujeto; y/o
  - (ii) la composición que tiene fluidez tiene una fluidez que permite la inyección con una aguja 21G tras dejar reposar la composición a 20 °C durante una hora.
9. La composición para su uso en el relleno de un núcleo pulposo de un disco intervertebral de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-8, en donde la composición no contiene una célula.
10. La composición para su uso en el relleno de un núcleo pulposo de un disco intervertebral de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-9, en donde el agente reticulante es un compuesto iónico metálico divalente o de mayor valencia.
11. La composición para su uso en el relleno de un núcleo pulposo de un disco intervertebral de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-10, en donde la composición se aplica en combinación con al menos una seleccionada de células y un factor para promover el crecimiento de las células, preferentemente las células se seleccionan de células del núcleo pulposo, células madre, células estromales, células madre mesenquimales, células estromales de médula ósea, células ES no humanas y células iPS, y en donde el factor para promover el crecimiento de las células se selecciona de BMP, FGF, VEGF, HGF, TGF-β, IGF-1, PDGF, proteína morfogenética derivada del cartílago (CDMP), CSF, EPO, IL, plasma rico en plaquetas (PRP), SOX e IF.

5 12. La composición para su uso en el relleno de un núcleo pulposo de un disco intervertebral de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-11, en donde la composición se usa para tratar, prevenir o suprimir la recurrencia de una degeneración de disco intervertebral y/o una lesión de disco intervertebral, preferentemente, la degeneración del disco intervertebral y/o la lesión del disco intervertebral es al menos una seleccionada del grupo que consiste en hernia discal, discopatía, espondilolistesis degenerativa, discitis piógena, espondilosis deformante, estenosis del canal espinal y una lesión del disco intervertebral.

10 13. La composición para su uso en el relleno de un núcleo pulposo de un disco intervertebral de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-12, en donde la composición está en estado seco o en estado de solución antes de aplicarse al sitio del núcleo pulposo, preferentemente la sal metálica monovalente de ácido algínico de baja endotoxina en estado seco es un liofilizado.

15 14. Un kit para su uso en el relleno de un núcleo pulposo de un disco intervertebral, el kit comprende al menos la composición de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-13 y un agente reticulante.

20 15. Una sal metálica monovalente de ácido algínico de baja endotoxina para su uso en el relleno de un núcleo pulposo de un disco intervertebral, en donde la sal metálica monovalente de ácido algínico de baja endotoxina se aplica al núcleo pulposo a través de una entrada de relleno de la composición en la superficie del disco intervertebral, y se cura poniendo en contacto un agente reticulante con la entrada de relleno en la superficie del disco intervertebral.

**Fig. 1**

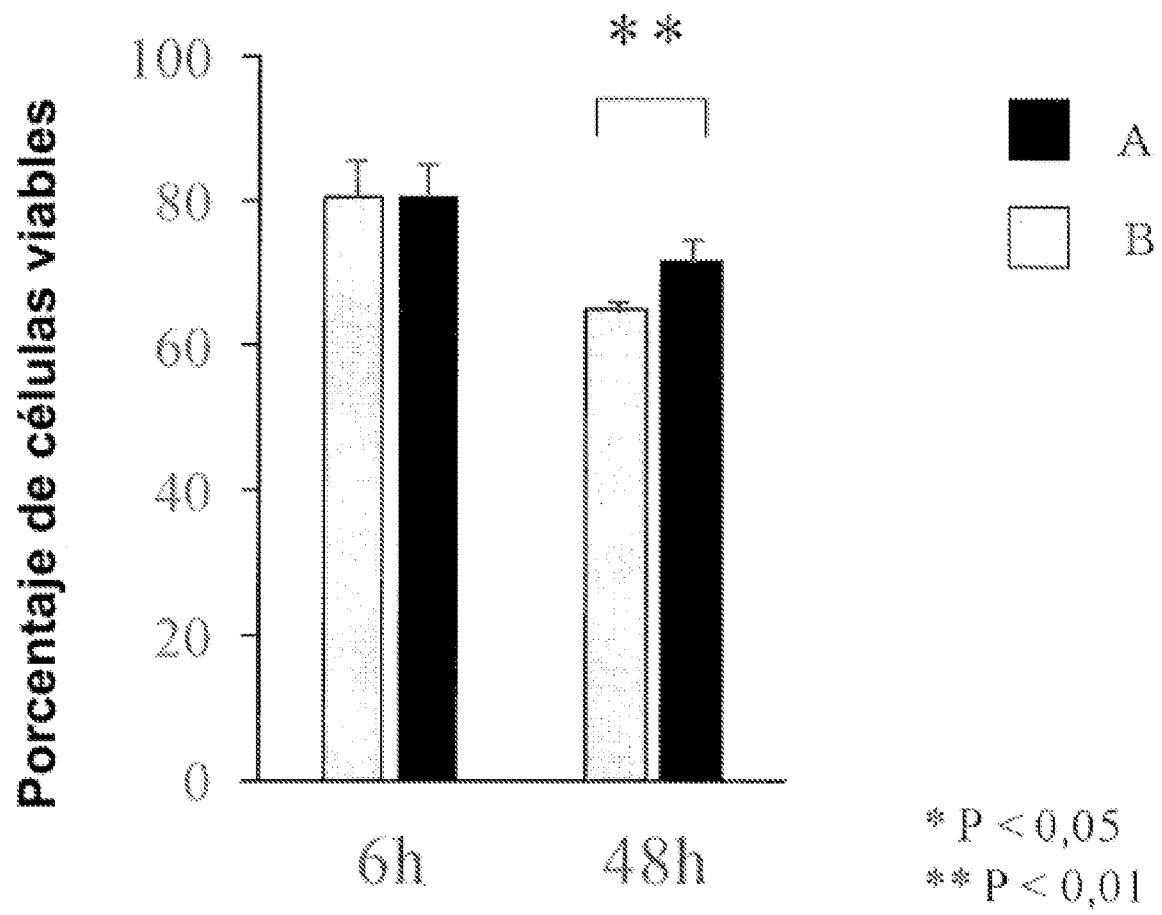
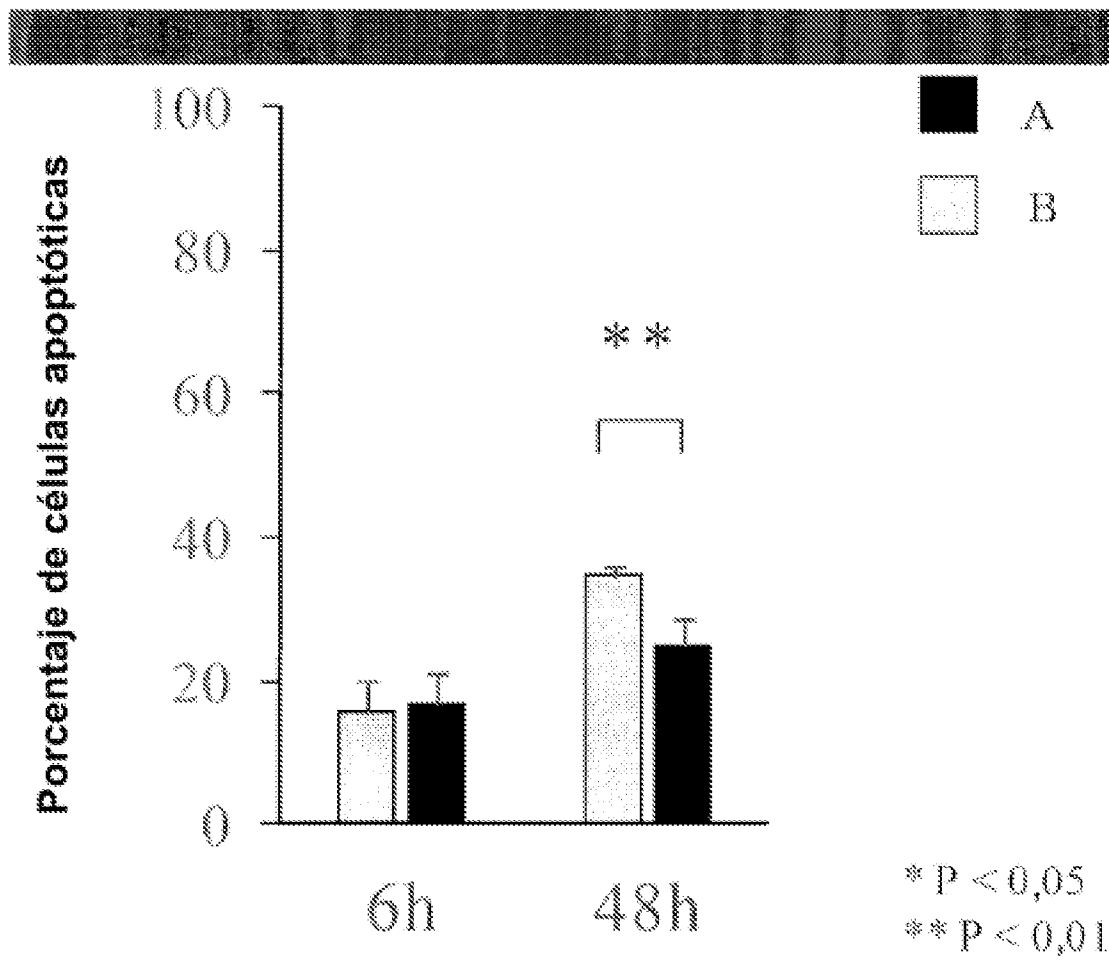
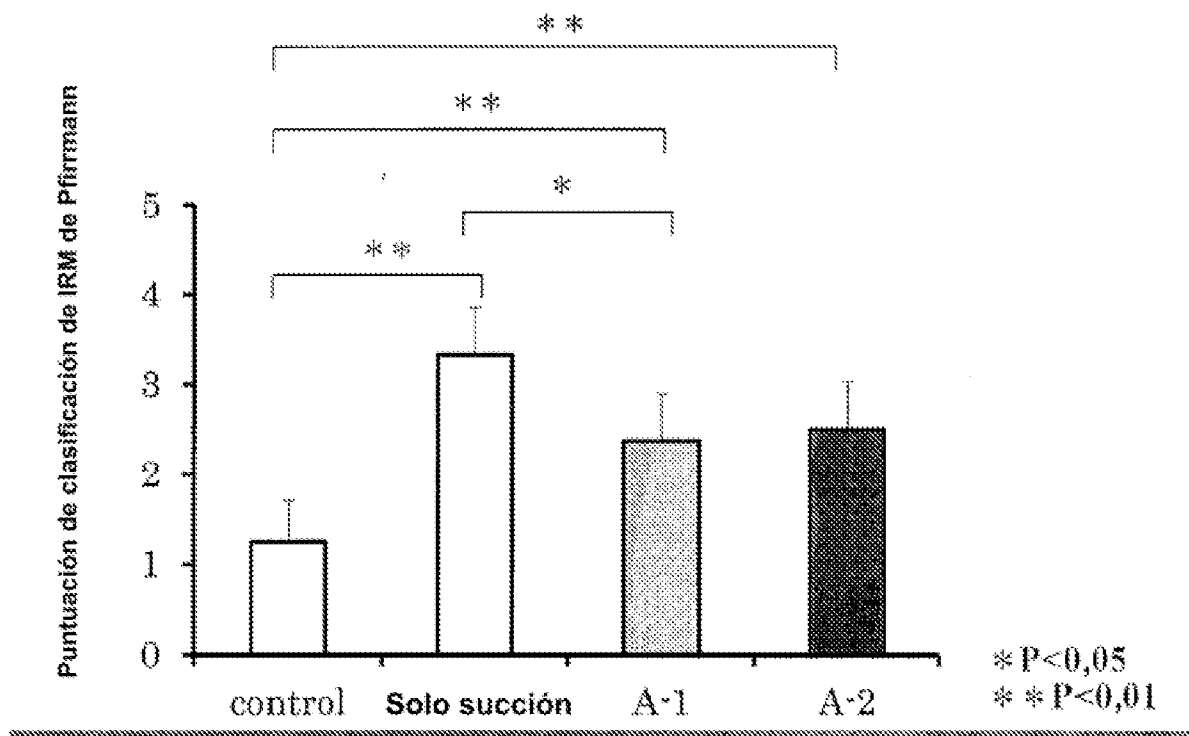


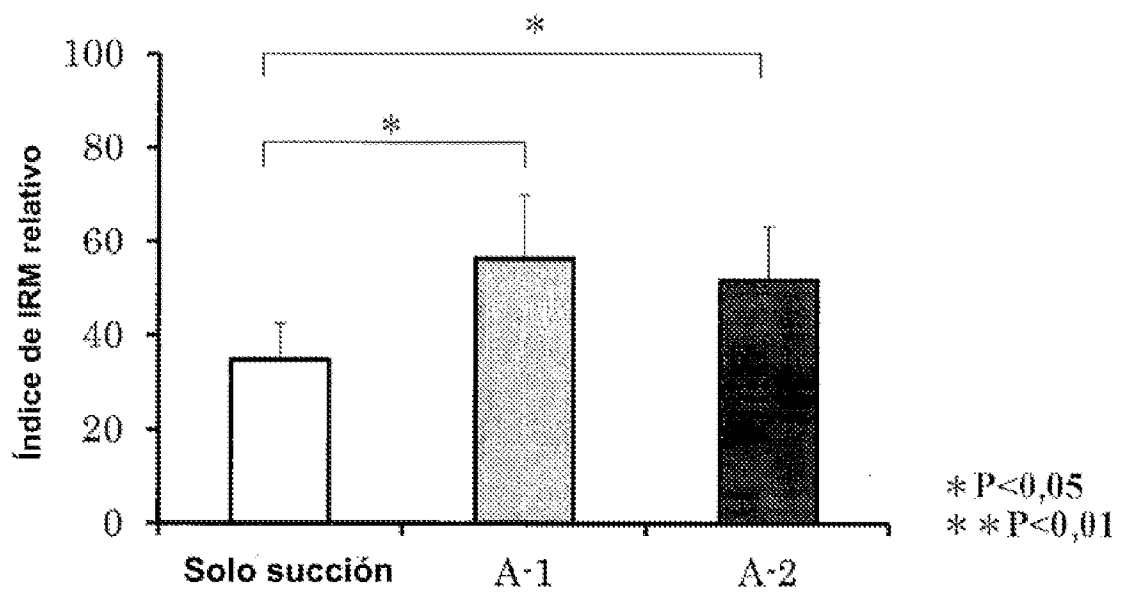
Fig. 2



**Fig. 3**



**Fig. 4**



**Fig. 5**

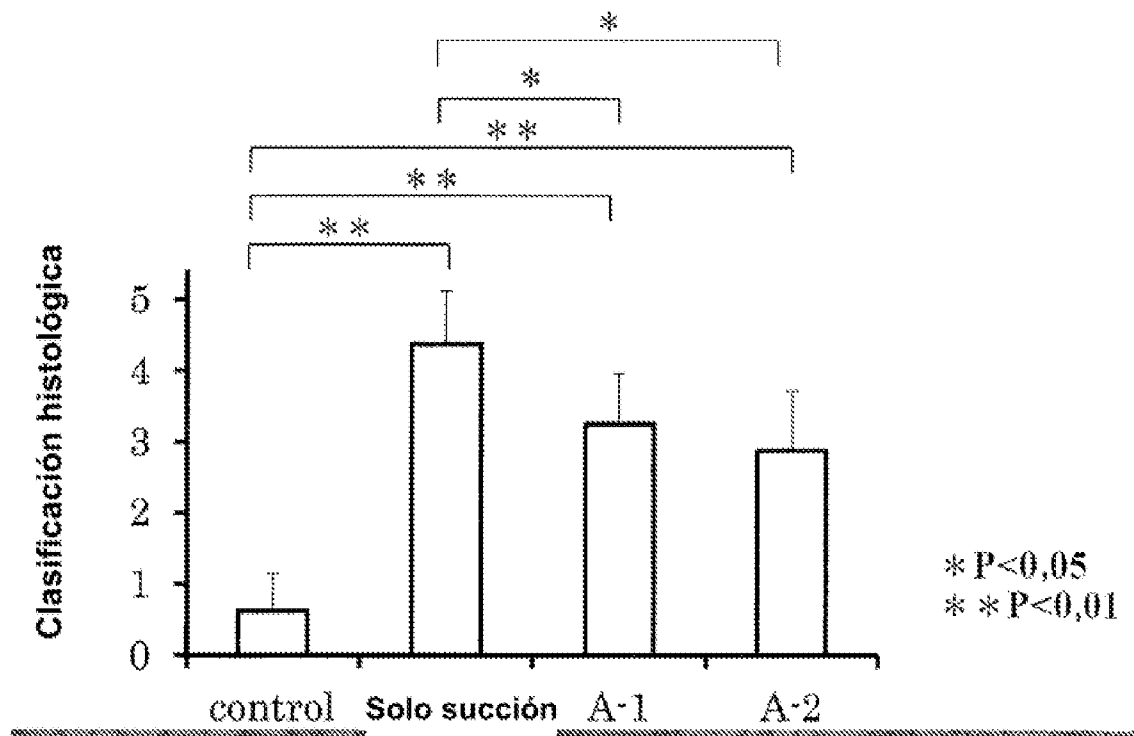


Fig. 6

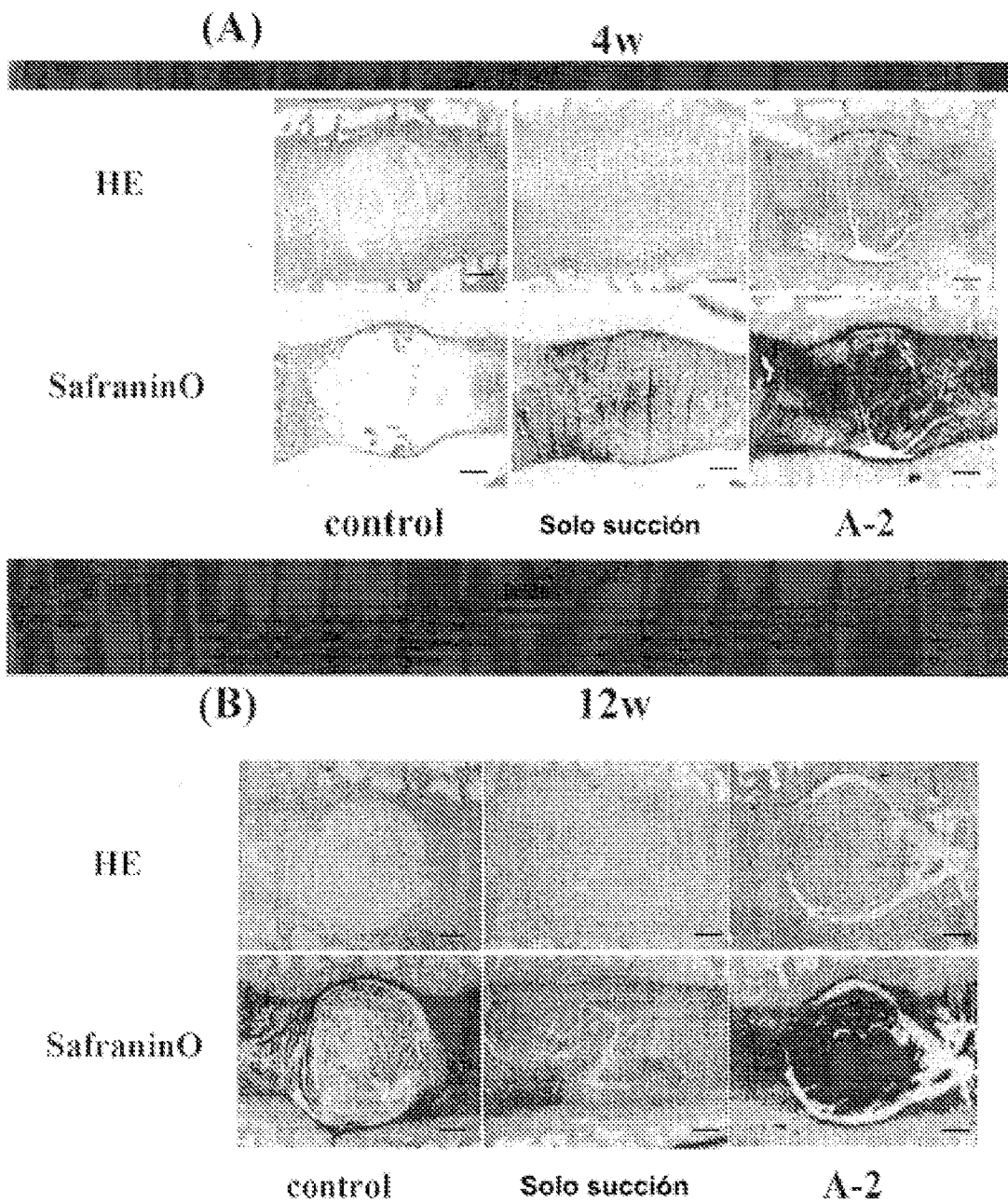
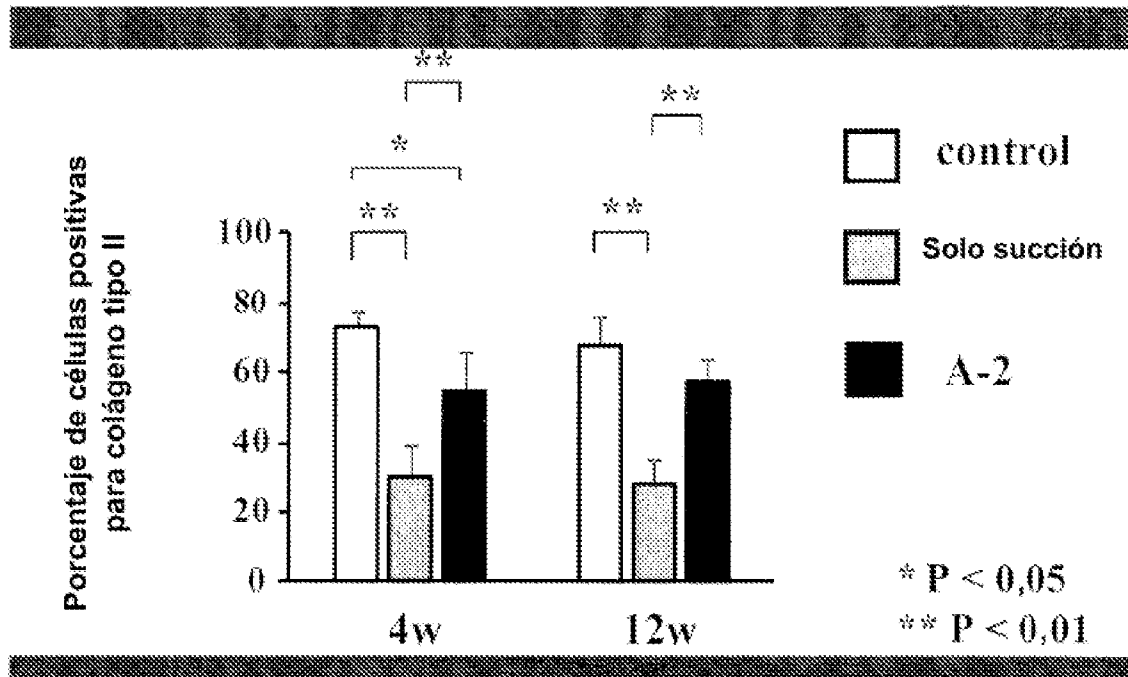
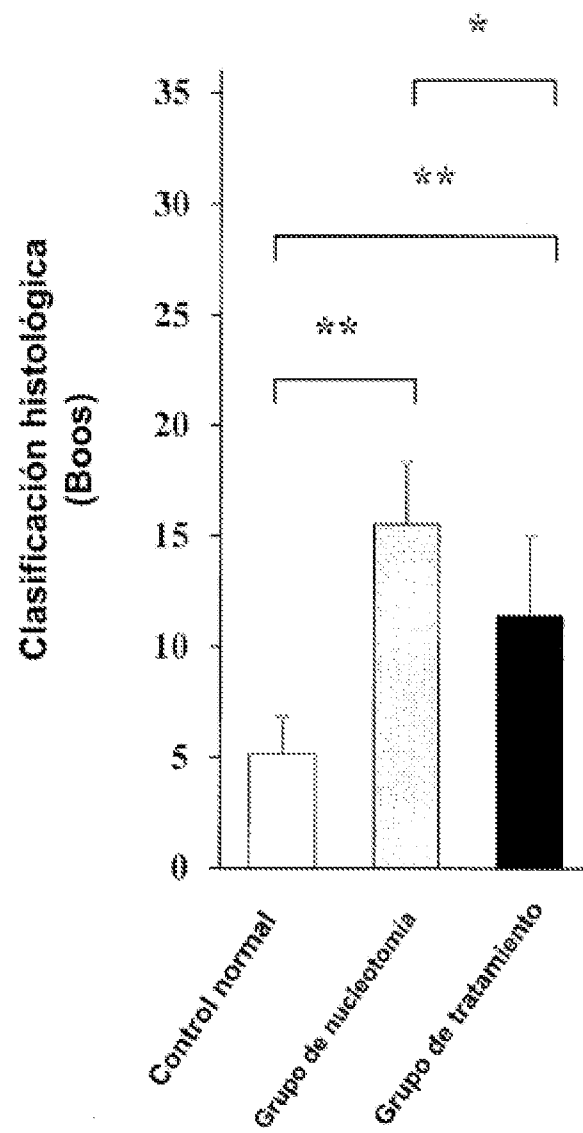


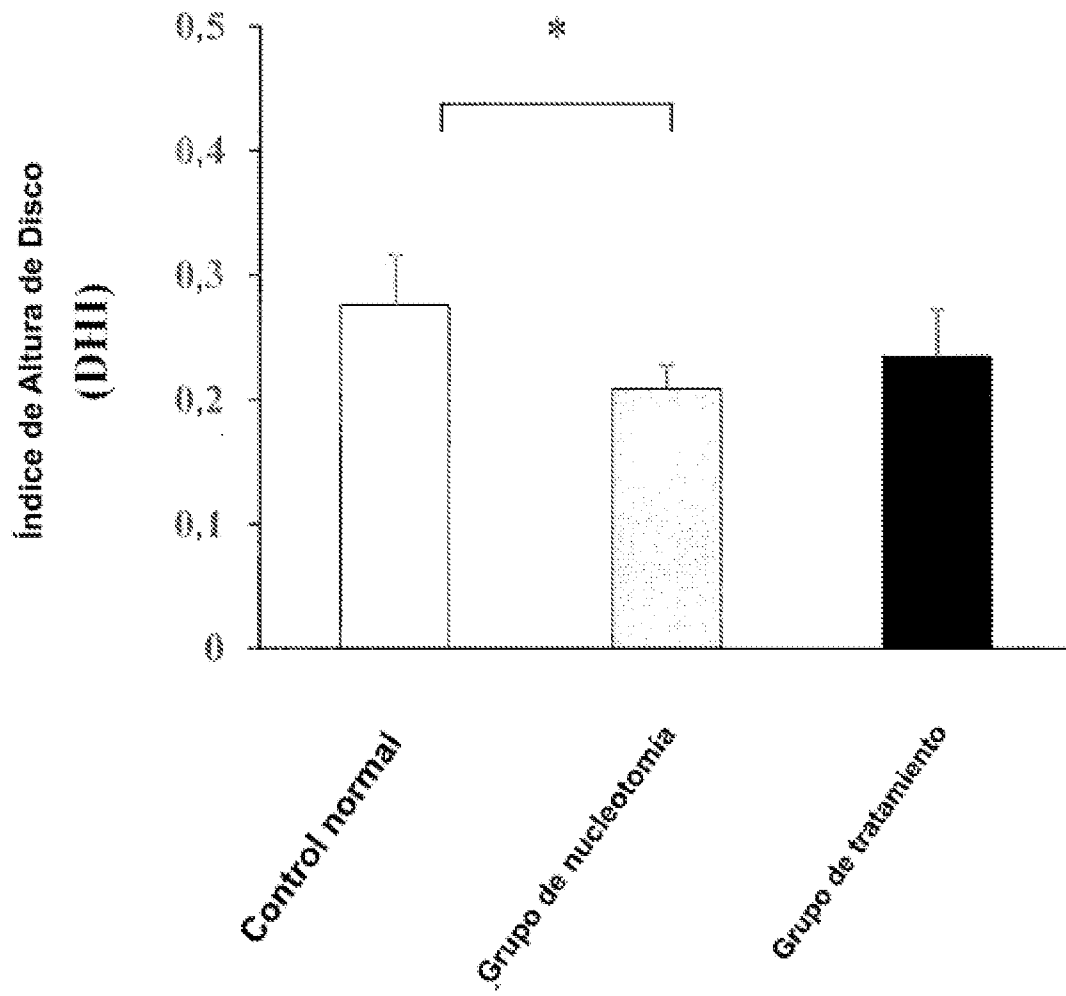
Fig. 7



**Fig. 8**



**Fig. 9**



**Fig. 10**

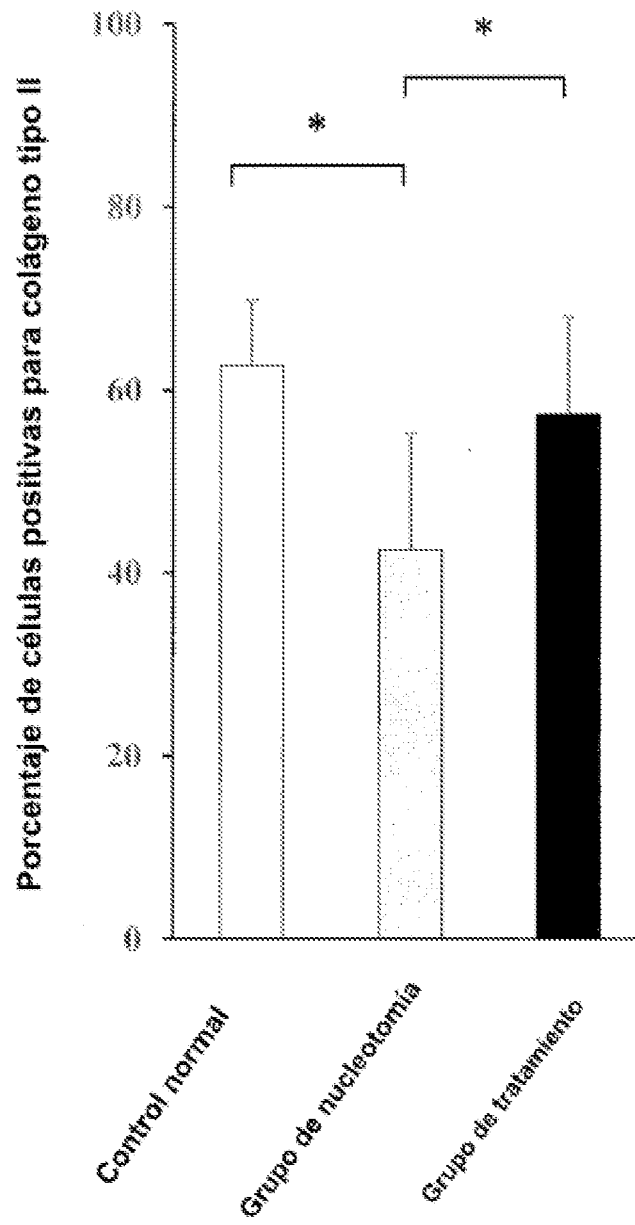


Fig. 11

