

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 370 205**

21 Número de solicitud: 201000670

51 Int. Cl.:  
**A61K 31/785** (2006.01)  
**A61P 19/00** (2006.01)

12

PATENTE DE INVENCION CON EXAMEN PREVIO

B2

22 Fecha de presentación: **18.05.2010**

43 Fecha de publicación de la solicitud: **13.12.2011**

Fecha de la concesión: **22.06.2012**

45 Fecha de anuncio de la concesión: **04.07.2012**

45 Fecha de publicación del folleto de la patente:  
**04.07.2012**

73 Titular/es:  
**UNIVERSIDAD DE SANTIAGO DE COMPOSTELA  
EDIFICIO EMPRENDIA-CAMPUS VIDA  
15782 SANTIAGO DE COMPOSTELA,  
A Coruña, ES**

72 Inventor/es:  
**Alvarez Lorenzo , Carmen;  
Rey Rico, Ana;  
SILVA RIVERA, MARIA TERESA;  
COUCEIRO FOLLENTE, JOSE y  
Concheiro Nine, Angel**

74 Agente/Representante:  
**No consta**

54 Título: **USO DE POLOXAMINAS COMO INDUCTORAS DE LA DIFERENCIACION OSTEOGENICA DE  
CELULAS MESENQUIMALES**

57 Resumen:

Uso de poloxaminas como inductoras de la diferenciación osteogénica de células mesenquimales. La presente invención se dirige a medicamentos, composiciones y métodos de aplicación en las que las poloxaminas son el ingrediente activo.

**ES 2 370 205 B2**

## DESCRIPCIÓN

Uso de poloxaminas como inductoras de la diferenciación osteogénica de células mesenquimales.

## 5 Sector de la técnica

La presente invención se enmarca en el campo de la inducción de diferenciación de células mesenquimales y progenitoras en osteoblastos.

## 10 Antecedentes

En situaciones patológicas graves (fracturas complejas, traumatismos, tratamiento de tumores óseos y reemplazamiento de articulaciones o defectos congénitos) el hueso dañado no se forma o regenera espontáneamente. Para restaurar su integridad estructural y funcional, se pueden aplicar autoinjertos o hueso "allogénico" procedente de bancos de tejidos, lo que no está exento de efectos adversos que pueden llegar a ser graves (Bauer y Muschler, Clin. Orthop. 10-27, 2000). Además, la terapia de reparación del hueso se puede complementar con la estimulación bioquímica de su curación local mediante la administración de factores de crecimiento que promueven la formación de osteoblastos (Lieberman *et al.*, J. Bone Joint Surg. Am. 84A, 1032-1044, 2002; Finkemeier. J. Bone Joint Surg. Am. 84, 454-464, 2002). La aplicación terapéutica de los factores de crecimiento plantea importantes dificultades derivadas de su corta semivida biológica, su deficiente estabilidad, su selectividad tisular y su toxicidad y actividad carcinogénica potencial. Ello hace que la búsqueda de moléculas sintéticas con capacidad osteogénica, mejor perfil de seguridad/eficacia y más accesibles desde el punto de vista económico constituya un área de investigación muy activa (Chun-Ya E. Han y col. Bioorg. Med. Chem. Lett. 19, 1442-1445, 2009). En este sentido, se ha demostrado ya la efectividad osteogénica de la simvastatina (Ayukawa y col., J. Oral Rehab. 37, 123-130, 2010).

En la patente WO20077108689 se reivindica un método *ex vivo* que comprende adicionar una poliamina sobre un medio de cultivo que contiene células madre en suspensión. En una reivindicación dependiente se concreta que las poliaminas son las moléculas de origen natural espermidina, espermina y sus precursores ornitina y putrescina. La estructura de la putrescina es  $H_2N-(CH_2)_4-NH_2$ , la ornitina es un aminoácido de fórmula  $H_2N-(CH_2)_3-CH(NH_2)-COOH$ , la espermidina es una triamina  $H_2N-(CH_2)_4-NH-(CH_2)_3-NH_2$  y la espermina es una tetramina  $H_2N-(CH_2)_3-NH-(CH_2)_4-NH-(CH_2)_3-NH_2$ . Todas ellas son aminas o poliaminas de bajo peso molecular caracterizadas por presentar grupos amino terminales y una distancia entre grupos amino de 3 ó más átomos de carbono.

Ming Cai y col. (Pharmazie 63, 751-756, 2008) han descrito la actividad osteogénica de CBMIDA (catecol-3,6-bis(ácido metiliminodiacético)).

Por otra parte, los copolímeros bloque con capacidad de gelificación *in situ* se han mostrado como excipientes farmacéuticos muy adecuados para la preparación de sistemas inyectables de factores de crecimiento que forman un depot en las inmediaciones de la zona de administración. Los polímeros bloque de poli(óxido de etileno)-poli(óxido de propileno)-poli(óxido de etileno), PEO-PPO-PEO, de la familia de los Pluronic han sido ampliamente ensayados como transportadores de factores de crecimiento, que son capaces de retenerlos y de proporcionar una cesión sostenida en el entorno del defecto óseo que se quiere corregir (Clokic y col. Plast. Reconstr. Surg. 105, 628-637, 2000). Los Pluronic por sí solos, en ausencia de factor de diferenciación, carecen de actividad osteogénica aunque sí se ha descrito su capacidad para inducir la formación de adipocitos a partir de células madre mesenquimales (Vashi y col. Biomaterials 29, 573-579, 2008).

Otra familia de copolímeros bloque de PEO y PPO es la de las poloxaminas o Tetronics, que presentan una estructura en estrella con cuatro brazos de PEO-PPO que terminan en grupos hidroxilo, unidos a través de un grupo etilendiamino central. Se encuentran disponibles comercialmente en una amplia variedad de pesos moleculares y relaciones molares EO/PO (Chiappetta y Sosnik. Eur. J. Pharm. Biopharm. 66, 303-317, 2007). Las poloxaminas se utilizan como agentes solubilizantes y estabilizantes de fármacos, para crear superficies stealth en nanopartículas, como componentes de hidrogeles para cesión controlada de fármacos y como componentes de líquidos de limpieza y conservación de lentes de contacto (Alvarez-Lorenzo y col. Frontiers in Bioscience E2, 424-440, 2010).

También se ha propuesto el uso de poloxaminas como componentes de sistemas de liberación de factores de crecimiento para el tratamiento de defectos óseos. Por ejemplo, Tae y col. (Composite comprising polysaccharide-functionalized nanoparticle and hydrogel matrix, a drug delivery system and a bone defect replacement matrix for sustained release comprising the same, and the preparation method thereof. U.S. Pat. Appl. Publ. (2007), Cont.-in-part of U.S. Ser. No. 391,480. CODEN: USXXCO US 2007248675 A1) reivindican la preparación y el uso de nanopartículas recubiertas con polímeros emulsificantes biocompatibles, entre los que se citan las poloxaminas, para controlar la cesión de factores de crecimiento. Por otra parte, en la solicitud de patente WO94/25080 se reivindica un método que comprende mezclar un hidrogel con células e implantarlas en un animal. Entre los copolímeros que se citan como componentes de los hidrogeles se encuentran las poloxaminas. En estos sistemas, las poloxaminas sólo actúan como excipientes inertes y no como sustancias activas.

65

### Descripción de la invención

En la presente invención se describe por primera vez la actividad de las poloxaminas como inductoras en la diferenciación de células mesenquimales o progenitoras. En particular, se demuestra que tienen capacidad osteogénica.

Por tanto se proporcionan métodos para tratar a pacientes que padecen defectos óseos en general, mediante la administración de una cantidad terapéuticamente eficaz de una composición farmacéutica de poloxaminas. Las poloxaminas son el ingrediente activo en estas composiciones, y por lo tanto, no se requiere de la incorporación de otras sustancias activas.

De este modo, un aspecto de la invención se dirige a una o varias poloxaminas para su uso como medicamento; en un aspecto particular se dirige a una o varias poloxaminas para su uso como medicamento para inducir diferenciación de células mesenquimales o progenitoras; en un aspecto más particular, para inducir la diferenciación de células mesenquimales o progenitoras en osteoblastos.

En otro aspecto particular, la invención se dirige a una o varias poloxaminas para su uso como medicamento para el tratamiento de defectos óseos creados en fracturas conminutas.

En otro aspecto particular se dirige a una o varias poloxaminas para su uso como medicamento para el tratamiento de fracturas asociadas a osteopenia. De entre dichas fracturas son típicas las de la zona distal del radio.

En un aspecto particular se dirige a una o varias poloxaminas para su uso como medicamento para el tratamiento de pseudoartrosis.

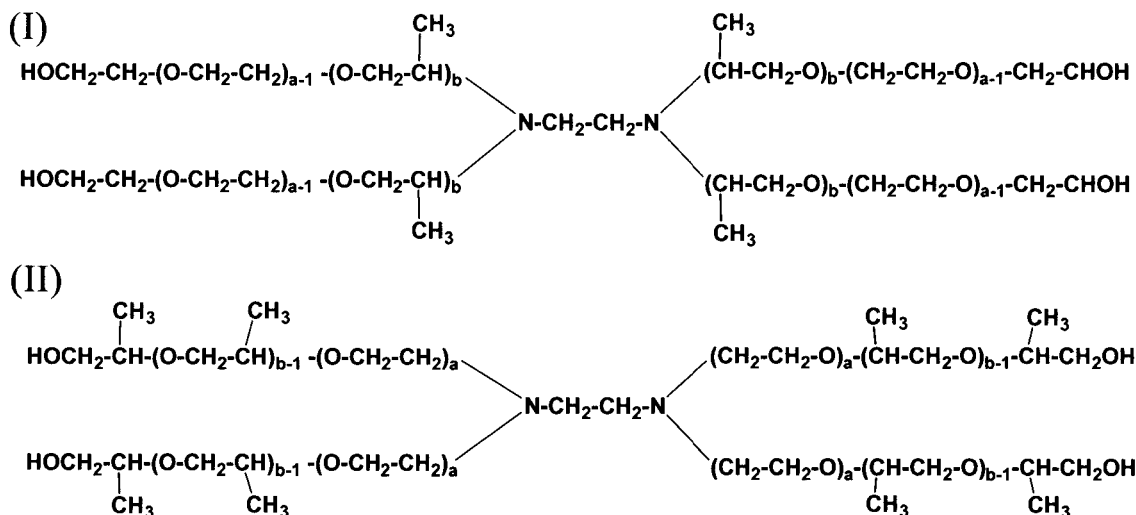
En un aspecto particular se dirige a una o varias poloxaminas para su uso como medicamento para el tratamiento de pérdidas de la reserva ósea. Dicha pérdida de la reserva ósea puede ser consecuencia de diversos problemas como por ejemplo la respuesta a ciertos materiales traducida en osteolisis y/o protección de esfuerzos, como ocurre en las prótesis articulares, en quistes oseoesenciales, gangliones intraóseos y fusiones espinales.

Las poloxaminas tienen grandes ventajas frente a las sustancias para las que se ha descrito hasta el momento capacidad osteogénica:

- Las poloxaminas, debido a que son polímeros sintéticos, tienen una estructura bien definida y conocida, y se incluyeron en numerosos ensayos para aplicaciones biomédicas, y su uso está autorizado en cosmética y productos de limpieza y conservación de lentes de contacto;
- Las poloxaminas son citocompatibles hasta proporciones muy elevadas, lo que hace que su margen de seguridad pueda ser más alto que el de los factores de crecimiento;
- No se ha descrito hasta el momento para las poloxaminas ninguna actividad farmacológica, por lo que no es previsible que de su uso se puedan derivar efectos secundarios relevantes;
- Se comercializan a precios mucho más bajos que los factores de crecimiento, por lo que ofrecen una mejor relación coste/efectividad;
- Son estables frente a la esterilización por procedimientos convencionales;
- En un intervalo de concentración adecuado para ejercer la actividad osteogénica, permiten preparar composiciones que se comportan como implantes inyectables, es decir, como sistemas de gelificación *in situ* que se pueden aplicar fácilmente por inyección y que permanecen en el lugar de aplicación durante tiempos prolongados.

Una ventaja adicional de la invención es que para la utilización de las poloxaminas como agentes osteoinductores no se requiere la modificación previa de su estructura, ni tampoco se requiere la incorporación de factores de crecimiento o sustancias osteogénicas adicionales.

Para la presente invención, se entiende por "poloxaminas" un copolímero de bloque de poli(óxido de etileno) (PEO) y poli(óxido de propileno) (PPO) que presentan una estructura en estrella con cuatro brazos de PEO-PPO que terminan en grupos hidroxilo; estos cuatro brazos están unidos a través de un grupo etilendiamino central, y se representan por las siguientes fórmulas generales I y II:



donde a tiene un valor entre 1 y 150 y b tiene un valor entre 1 y 150.

Las poloxaminas se encuentran disponibles comercialmente en una amplia variedad de pesos moleculares y relaciones molares EO/PO (catálogo de BASF, The Chemical Company, en la edición de Norte América, sección marcas en la clasificación de productos químicos). Son ejemplos de poloxaminas útiles para la invención, los Tetronic (marca registrada de BASF) 304, 701, 901, 904, 908, 1107, 1301, 1304, 1307, 90R4 y 150R1 caracterizados por las propiedades que se especifican en la tabla 1.

TABLA 1

| Tetronic | Peso Molecular (Da) | EO unidades por bloque (a) | PO unidades por bloque (b) | Balace hidrofília-lipofília (HLB) | Cloud point 1 % (°C) |
|----------|---------------------|----------------------------|----------------------------|-----------------------------------|----------------------|
| 304      | 1650                | 3.7                        | 4.3                        | 12-18                             | 75                   |
| 701      | 3600                | 2.1                        | 14.0                       | 1-7                               | 18                   |
| 901      | 4700                | 2.7                        | 18.2                       | 1-7                               | 20                   |
| 904      | 6700                | 15                         | 17                         | 12-18                             | 74                   |
| 908      | 25000               | 114                        | 21                         | > 24                              | > 100                |
| 1107     | 15000               | 60                         | 20                         | 18-23                             | > 100                |
| 1301     | 6800                | 4                          | 26                         | 1-7                               | 16                   |
| 1304     | 10500               | 21.4                       | 27.1                       | 12-18                             | ---                  |
| 1307     | 18000               | 72                         | 23                         | > 24                              | > 100                |
| 90R4     | 6900                | 16                         | 18                         | 1-7                               | 43                   |
| 150R1    | 8000                | 5                          | 30                         | 1-7                               | 20                   |

Otro aspecto de la invención se dirige hacia una composición farmacéutica que consiste en una disolución o dispersión acuosa esterilizada de una o varias poloxaminas para inducir la diferenciación de células mesenquimales o progenitoras. En particular, para inducir la diferenciación de células mesenquimales o progenitoras en osteoblastos.

5

Otro aspecto de la invención se dirige hacia una composición farmacéutica que consiste en una disolución o dispersión acuosa esterilizada, de una o varias poloxaminas para el tratamiento de defectos óseos creados en fracturas conminutas, fracturas asociadas a osteopenia, pseudoartrosis, y pérdida de la reserva ósea.

10 En un aspecto particular, la invención se dirige al uso de una o varias poloxaminas para la preparación de dichas composiciones farmacéuticas.

15 En la presente invención, se entiende por “composición farmacéutica” una composición líquida para constituir un medicamento; de forma preferida para su administración parenteral. Por ejemplo, las composiciones farmacéuticas de la invención pueden administrarse en forma de implante mediante una inyección en la zona específica en la que el paciente sufre la patología, que gelifica a la temperatura corporal y produce sus efectos durante un tiempo continuado en la zona a tratar.

20 Otro aspecto de la invención se dirige a un gel viscoelástico obtenible mediante un procedimiento que comprende poner en contacto a) una disolución o dispersión acuosa esterilizada de una o varias poloxaminas, con b) células mesenquimales o progenitoras, siendo la concentración total de poloxaminas en la etapa a) superior a la concentración crítica de gelificación a la temperatura del medio en el que se encuentran las células mesenquimales o progenitoras.

25 Para la presente invención, se entiende por “concentración crítica de gelificación” aquella a la que la disolución de poloxamina experimenta una transición de sol a gel a la temperatura a la que se encuentran las células mesenquimales o progenitoras o a la temperatura corporal.

30 En una realización particular, cuando la concentración total de poloxaminas supere la concentración crítica de gelificación a la temperatura del medio en el que se encuentran las células mesenquimales o progenitoras, la composición debe conservarse entre 3 y 7°C hasta el momento de la aplicación. Cuando esta aplicación se lleva a cabo empleando una jeringa, el mantenimiento en frío asegura una buena jeringabilidad.

35 Las células mesenquimales o progenitoras pueden encontrarse *in vivo* o *in vitro*.

En una realización particular, las células mesenquimales o progenitoras de la etapa b) se encuentran en un medio de cultivo *in vitro*. Es posible realizar este procedimiento mediante el empleo de una pipeta o jeringa.

40 De forma preferida, las disoluciones o dispersiones acuosas esterilizadas de una o varias poloxaminas de la invención, presentan una concentración total de poloxaminas comprendida entre el 2 y el 30%. De forma más preferida, la concentración total de poloxaminas está comprendida entre el 10 y el 20%.

45 En otro aspecto, la invención se dirige a un procedimiento para la preparación de una composición farmacéutica, como se describió anteriormente, que consiste en una disolución o dispersión acuosa esterilizada de una o varias poloxaminas, que comprende a) mezclar una o varias poloxaminas en un medio acuoso a pH entre 6.5 y 7.5 y a una temperatura entre 0 y 37°C, y b) esterilización de la mezcla.

50 En un aspecto particular, el procedimiento comprende una etapa adicional después de la etapa a) y antes de la etapa b), que consiste en añadir un agente isotonzante.

Se entiende por agente isotonzante, cualquier sustancia que incremente la presión osmótica de una disolución acuosa como por ejemplo el cloruro sódico, la glicerina, la glucosa, el manitol o el sorbitol.

55 La etapa b) de esterilización puede llevarse a cabo mediante procesos conocidos por el experto en la materia, entre ellos, están en la práctica común los que se citan en el siguiente grupo: filtración en condiciones estériles, calor húmedo en el envase definitivo, o radiaciones ionizantes y no ionizantes.

60 En otro aspecto la invención también se dirige a un método para inducir la diferenciación de células mesenquimales o progenitoras en osteoblastos que comprende poner en contacto a) una disolución o dispersión acuosa esterilizada de una o varias poloxaminas, con b) células mesenquimales o progenitoras.

En un aspecto particular, las células mesenquimales o progenitoras se encuentran en un medio de cultivo y el método se realiza *in vitro*.

65 En un aspecto particular, se exceptúan de las células mesenquimales o progenitoras, las células madre procedentes de embriones humanos.

En otro aspecto particular, la disolución o dispersión de la etapa a) se administra a animales o a humanos *in vivo*, en particular, mediante inyección en la zona donde debe inducir la diferenciación de células mesenquimales o progenitoras en osteoblastos.

- 5 De este modo, cuando la concentración total de poloxaminas supere la concentración crítica de gelificación a la temperatura corporal, se formará *in situ* un depot de consistencia semisólida o gel viscoelástico.

### Descripción de las figuras

- 10 Figura 1. Viabilidad celular al cabo de 24 horas de estar en contacto con las disoluciones de poloxaminas (n=3) de distintas concentraciones. 0.01 %p/p: columna blanca; 0.1%p/p: gris claro; 1%p/p: gris oscuro; 5%: negro.

Figura 2. Módulos elástico (G', símbolos cerrados) y viscoso (G'', símbolos abiertos) de disoluciones de Tetronic al 20% en Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) antes y después de ser autoclavadas.

- 15 Figura 3. Actividad de la fosfatasa alcalina (ALP) de las células cultivadas en presencia de distintas poloxaminas. También se muestran los datos correspondientes a los controles positivo y negativo.

### Ejemplos de la invención

- 20 Los siguientes ejemplos son ilustrativos de la invención y no deben interpretarse como limitativos de la misma. Se incluyen ejemplos para ilustrar la citocompatibilidad, capacidad gelificante y capacidad osteoinductora de las poloxaminas en disolución.

### 25 Modo de realización de la invención

- La poloxamina o combinaciones de varias poloxaminas se disuelven bajo agitación en agua o medio tampón de pH adecuado (entre 6.5 y 7.5), preferentemente pH 7.4. La concentración total en poloxamina puede estar comprendida entre el 2 y el 30%, preferiblemente entre el 10 y el 20%. La temperatura del medio de disolución puede estar comprendida entre 0 y 37°C, preferiblemente entre 4 y 20°C, para evitar la formación de un gel durante la preparación de la disolución. La presión osmótica de la disolución se puede ajustar con NaCl.

La disolución de poloxamina se esteriliza por calor húmedo a 121°C durante 20 minutos.

### 35 Ejemplo 1

#### *Citocompatibilidad de las poloxaminas*

- 40 Se prepararon disoluciones de Tetronic 304, 901, 904, 908, 1170, 1301, 1307, y 150R1 al 10%, disolviendo la cantidad necesaria de cada poloxamina en el volumen adecuado de tampón fosfato pH 7.4. Las disoluciones se filtraron a través de membranas de 0.2  $\mu$ m. Se cultivaron células CHO-K1 y Balb/3T3 en medio D-MEM sin rojo fenol, conteniendo suero fetal bovino (10% p/v) y gentamicina (130  $\mu$ g/100 ml). Se sembraron 5000 células por pocillo (50  $\mu$ l) en placas de 96 pocillos y se adicionaron 50  $\mu$ l de disolución de poloxamina convenientemente diluida para que la concentración en el pocillo fuese de 0.01, 0.1, 1 ó 5% p/v. Las placas se incubaron 24 h a 37°C en atmósfera 5%CO<sub>2</sub> humidificada. Las células supervivientes se evaluaron usando un kit de citotoxicidad LDH y la absorbancia se midió a 490 nm. En la Figura 1 se muestran los resultados obtenidos.

En líneas generales, los copolímeros con peso molecular elevado y carácter hidrofílico (Tetronic 908, 1107, 1301 y 1307) mostraron alta citocompatibilidad.

50

### Ejemplo 2

#### *Viabilidad de los osteoblastos*

- 55 Se prepararon disoluciones concentradas de Tetronic 908, 1107, 1301 y 1307 al 20% p/p en medio DMEM sin rojo fenol a 4°C y se filtraron a través de membranas de 0.2  $\mu$ m. Se cultivaron células SAOS-2 en medio DMEM suplementado con suero fetal bovino (10% w/v) y gentamicina (130  $\mu$ g/100 ml). Se sembraron 200.000 células por pocillo (1.5 ml) en placas de 24 pocillos y se adicionaron 0.5 ml de disolución de poloxamina. Las placas se incubaron 60 24 h a 37°C en atmósfera 5%CO<sub>2</sub> humidificada. Las células se tripsinizaron y se incubaron a 37°C durante 5 minutos. A continuación, las células se centrifugaron (1400 rpm, 4 min) y se resuspendieron en medio DMEM fresco, se diluyeron alícuotas de 100  $\mu$ l de suspensión de células con 200  $\mu$ l de tampón fosfato de pH 7.4. Se transfirieron a un citospin para fijar las células en un portaobjetos. A continuación, se efectuó una tinción con calceína/ioduro de propidio. Las tinciones revelaron que la viabilidad fue superior al 90% después de 24 horas de contacto con las disoluciones de poloxamina al 20%.

65

## Ejemplo 3

*Capacidad de las poloxaminas para formar geles a temperatura corporal*

5 Se prepararon disoluciones concentradas de Tetronic 908, 1107, 1301 y 1307 al 20% p/p en tampón fosfato pH 7.4 y DMEM. Se registró la evolución de los módulos elástico ( $G'$ ) y viscoso ( $G''$ ) en función de la temperatura entre 15 y 45°C, a una velocidad de calefacción de 2°C/min, aplicando una velocidad de oscilación de 5 rad/s. Los ensayos se llevaron a cabo con alícuotas de disolución sin autoclavar y con otras esterilizadas en autoclave a 121°C durante 20 min.

10

A 20°C las disoluciones presentaron una viscosidad muy baja, que corresponde a un sistema fácilmente jeringable. La temperatura de gelificación del Tetronic 908 se situó en 33°C y para los Tetronic 1107, 1301 y 1307 en 25°C (Figura 2). A 37°C todos los sistemas se comportaron como geles con módulo elástico comprendido entre  $10^3$  y  $10^4$  Pa y el autoclavado no modificó el comportamiento reológico de las disoluciones.

15

## Ejemplo 4

*Capacidad de osteoinducción*

20

Se cultivaron células madre mesenquimales en medio MesenPRO RS™ adecuadamente suplementado y se sembraron ( $3 \cdot 10^4$  células/pocillo, 1.5 ml) en placas de 6 pocillos. Se añadieron 200  $\mu$ l de disolución de poloxamina al 20% en tampón fosfato de pH 7.4 en el compartimento superior de cada Transwell®. En total se incorporaron a cada pocillo 40 mg de poloxamina. Como controles negativo y positivo se utilizaron células en medio basal y células en medio de diferenciación osteogénica (10 mM  $\beta$ -glicerofosfato, 100  $\mu$ M dexametasona y 50  $\mu$ l/ml ácido ascórbico), respectivamente. Las placas se incubaron a 37°C en atmósfera de 5% CO<sub>2</sub> humidificada. El medio se reemplazó con medio fresco dos veces a la semana. Para llevar a cabo el ensayo de fosfatasa alcalina (ALP), las células se lisaron al cabo de 3, 7, 14 y 23 días por adición de 150  $\mu$ l de tampón Tris HCl 10 mM de pH 7.5 con 0.1% Tritón X-100. Las muestras se sometieron a tres ciclos de congelación (-80°C)/descongelación (45 min por ciclo). Los lisados se lavaron por centrifugación a 14.000 rpm durante 15 minutos a 4°C. Cada muestra (50  $\mu$ l) se incubó con 150  $\mu$ l de sustrato de ALP en placas de 96 pocillos a 37°C durante 30 min. La absorbancia de las muestras se leyó a 405 nm usando un lector de ELISA. Se usó una curva de calibración de p-nitrofenilfosfato para determinar la concentración de ALP. Las medidas de actividad ALP se normalizaron por el contenido en proteína, que se midió por el ensayo de proteína BCA, y los resultados se expresaron como micromoles de ALP por minuto y por mg de proteína.

35

También se llevaron a cabo dos análisis histoquímicas, visualizando la actividad ALP de la manera siguiente: las células se fijaron con una disolución de paraformaldehído al 4% durante 5 min, se lavaron con tampón fosfato, se incubaron en la oscuridad con naftol ASMX-fosfato al 0.1% y violeta rápido al 0.1% AMPD 56 mM y se observaron al microscopio óptico. Para detectar la mineralización de las células se efectuó una tinción con rojo de alizarina. Las células se fijaron con etanol 70% durante 1 hora y se lavaron con agua dos veces. A continuación, se tiñeron con rojo de alizarina al 2% durante 30 min, se lavaron con agua tres veces y se observaron las células al microscopio.

40

En la Figura 3 se muestran los perfiles de actividad ALP obtenidos con las poloxaminas Tetronic 908, 1107 y 1307 y con controles negativo y positivo de osteogeneidad. Los controles negativos indican que la actividad ALP se incrementa ligeramente a los 7 días retornando después a los valores basales. La actividad ALP de las células mesenquimales cultivadas en medio osteogénico estándar (control positivo) mostraron un máximo en el día 7, que fue mucho más intenso que el que se observó con el control negativo. Los geles de poloxamina indujeron un crecimiento progresivo de la actividad ALP durante dos o tres semanas.

45

50 Los geles de poloxamina dieron lugar a la proliferación de las células mesenquimales durante la primera semana y, a continuación, a la diferenciación a osteoblastos en la segunda y la tercera semana. La tinción de alizarina mostró nódulos de mineralización en los cultivos con las poloxaminas Tetronic 908, 1107 y 1307, al cabo de 23 días.

55

60

65

**REIVINDICACIONES**

- 5 1. Uso de una o varias poloxaminas para inducir la diferenciación de células mesenquimales o progenitoras en osteoblastos, con la condición de que se exceptúan las células madre procedentes de embriones humanos.
2. Uso de una o varias poloxaminas para la preparación de un medicamento para el tratamiento de defectos óseos creados en fracturas conminutas.
- 10 3. Uso de una o varias poloxaminas para la preparación de un medicamento para el tratamiento de fracturas asociadas a osteopenia.
4. Uso de una o varias poloxaminas para la preparación de un medicamento para el tratamiento de pseudoartrosis.
- 15 5. Uso de una o varias poloxaminas para la preparación de un medicamento para el tratamiento de pérdidas de la reserva ósea.
6. Composición farmacéutica que consiste en una disolución o dispersión acuosa esterilizada de una o varias poloxaminas para inducir la diferenciación de células mesenquimales o progenitoras en osteoblastos.
- 20 7. Composición farmacéutica según la reivindicación 6, donde la concentración total de poloxaminas está comprendida entre el 2 y el 30%.
8. Composición farmacéutica según la reivindicación 7, donde la concentración total de poloxaminas está comprendida entre el 10 y el 20%.
- 25 9. Procedimiento para la preparación de una composición farmacéutica, como se describió en las reivindicaciones 6 a 8, que comprende a) mezclar una o varias poloxaminas en un medio acuoso a pH entre 6.5 y 7.5 y a una temperatura entre 0 y 37°C, y b) esterilización de la mezcla.
- 30 10. Procedimiento según la reivindicación 9, que comprende una etapa adicional después de la etapa a) y antes de la etapa b), que consiste en añadir un agente isotonzante.
11. Procedimiento según las reivindicaciones 9 y 10, donde el pH es 7.4.
- 35 12. Procedimiento según las reivindicaciones 9 a 11, donde la esterilización se lleva a cabo mediante un proceso seleccionado del siguiente grupo: filtración en condiciones estériles, aplicación de calor húmedo en el envase definitivo, y radiaciones ionizantes o no ionizantes.
- 40 13. Método para inducir la diferenciación de células mesenquimales o progenitoras, excepto células madre embrionarias humanas, en osteoblastos que comprende poner en contacto a) una disolución o dispersión acuosa esterilizada de una o varias poloxaminas, con b) células mesenquimales o progenitoras, excepto células madre embrionarias humanas, que se encuentran en un medio de cultivo y el método se realiza *in vitro*.

45

50

55

60

65



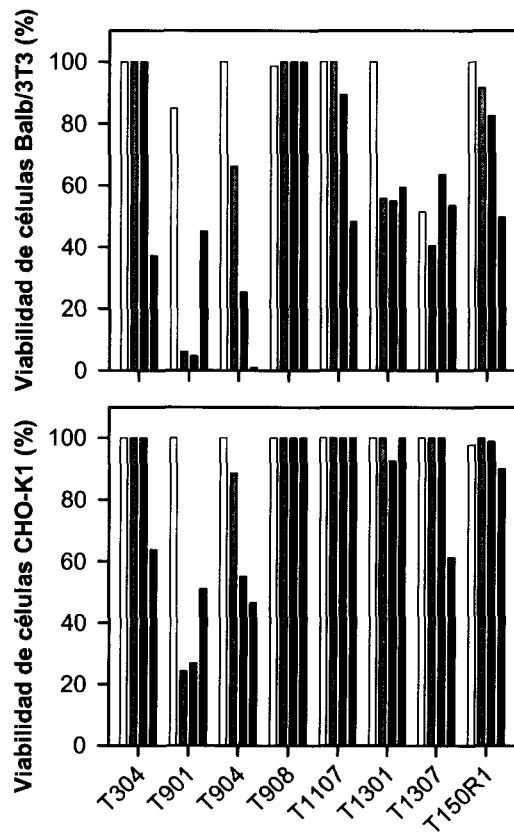


Figura 1

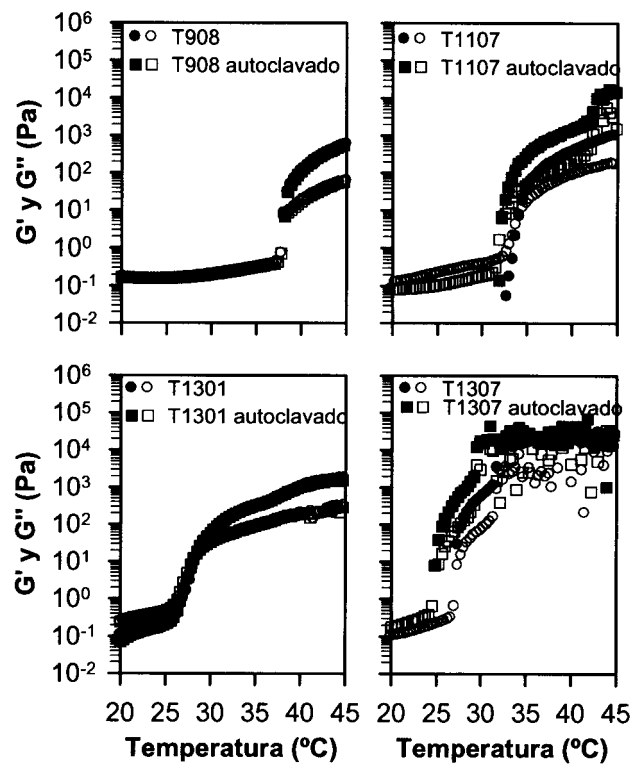


Figura 2

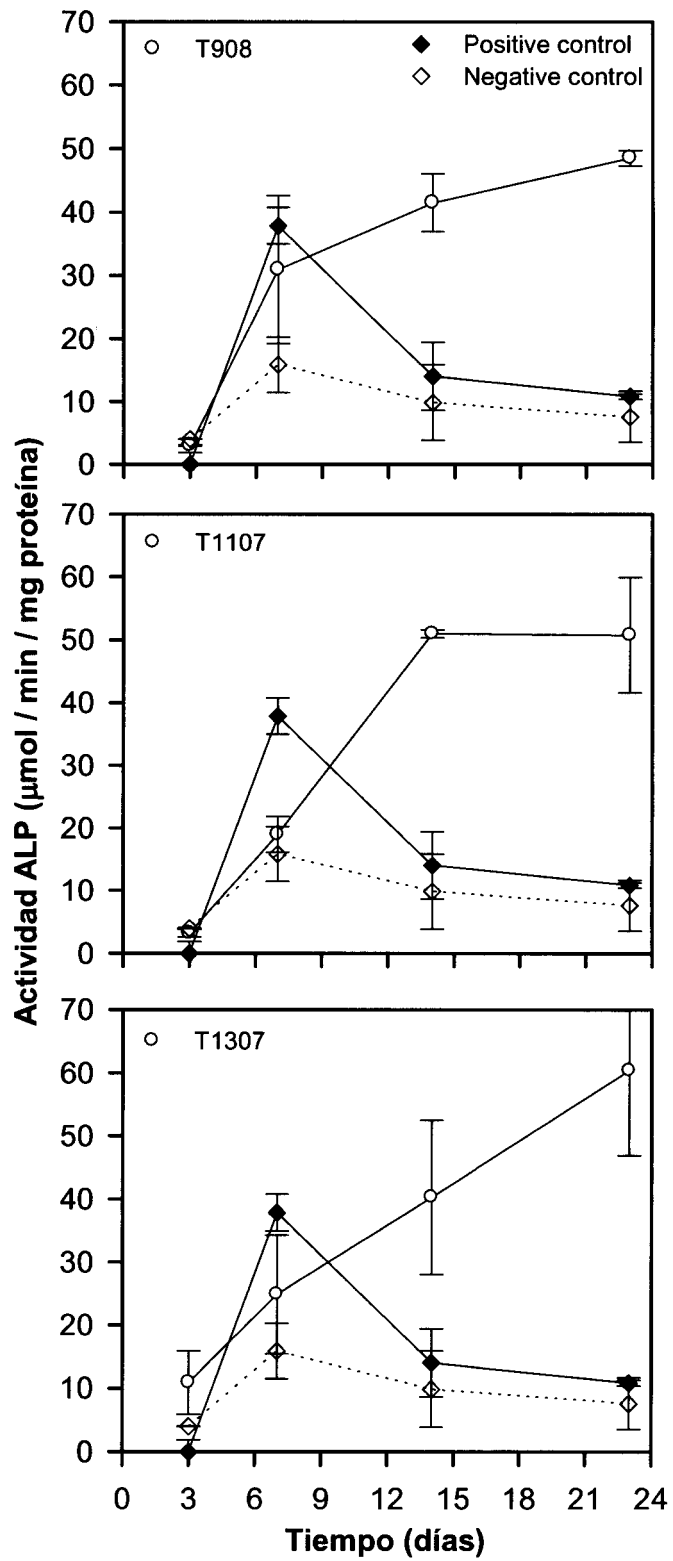


Figura 3



OFICINA ESPAÑOLA  
DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

②① N.º solicitud: 201000670

②② Fecha de presentación de la solicitud: 18.05.2010

③② Fecha de prioridad:

INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TECNICA

⑤① Int. Cl.: **A61K31/785** (2006.01)  
**A61P19/00** (2006.01)

DOCUMENTOS RELEVANTES

| Categoría | Documentos citados  | Reivindicaciones afectadas |
|-----------|---|----------------------------|
| A         | ALVAREZ-LORENZO, C. y col. Tetronic micellization, gelation and drug solubilization: Influence of pH and ionic strength . European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics. Mayo 2007, Vol. 66, N° 2, páginas 244-252 . Todo el documento.  | 1-13                       |
| A         | CHIAPPETTA, D.A. y SOSNIK, A. Poly(ethylene oxide)-poly(propylene oxide) block copolymer micelles as drug delivery agents: Improved hydrosolubility, stability and bioavailability of drug. European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics. 2007, Vol. 66, N° 3, páginas 303-317. Todo el documento.                                | 1-13                       |
| A         | WO 2008154368 A2 (UNIVERSITY OF VIRGINIA PATENT FOUNDATION) 18.12.2008, Página 5, líneas 23-26; reivindicaciones 1 y 45; página 57, línea 26 – página 62, línea 33.   | 6-8                        |
| A         | LIPPENS, E. y col. Evaluation of bone regeneration with an injectable, in situ polymerizable Pluronic F127 hydrogel derivative combined with autologous mesenchymal stem cells in a goat tibia defect model. Tissue Engineering, Part A. 2010 Febrero, Vol.16, N° 2, páginas 617-627. Todo el documento, en especial resumen, última frase. | 1-13                       |

Categoría de los documentos citados

X: de particular relevancia

Y: de particular relevancia combinado con otro/s de la misma categoría

A: refleja el estado de la técnica

O: referido a divulgación no escrita

P: publicado entre la fecha de prioridad y la de presentación de la solicitud

E: documento anterior, pero publicado después de la fecha de presentación de la solicitud

**El presente informe ha sido realizado**

para todas las reivindicaciones

para las reivindicaciones nº:

**Fecha de realización del informe**  
15.07.2011

**Examinador**  
E. Albarrán Gómez

**Página**  
1/5



OFICINA ESPAÑOLA  
DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

②① N.º solicitud: 201000670

②② Fecha de presentación de la solicitud: 18.05.2010

③② Fecha de prioridad:

### INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TÉCNICA

⑤① Int. Cl.: **A61K31/785** (2006.01)  
**A61P19/00** (2006.01)

### DOCUMENTOS RELEVANTES

| Categoría | Documentos citados  | Reivindicaciones afectadas |
|-----------|---|----------------------------|
| A         | JAU-WEN HUANG y col. Osteoblastic differentiation of rabbit mesenchymal stem cells loaded in a carrier system of Pluronic F127 and Interpore. Chang Gung Medical Journal. 2006, Vol. 29, Nº 4, páginas 363-372, ISSN 2072-0939. Todo el documento en especial "DISCUSSION". | 1-13                       |

#### Categoría de los documentos citados

X: de particular relevancia

Y: de particular relevancia combinado con otro/s de la misma categoría

A: refleja el estado de la técnica

O: referido a divulgación no escrita

P: publicado entre la fecha de prioridad y la de presentación de la solicitud

E: documento anterior, pero publicado después de la fecha de presentación de la solicitud

#### El presente informe ha sido realizado

para todas las reivindicaciones

para las reivindicaciones nº:

Fecha de realización del informe  
15.07.2011

Examinador  
E. Albarrán Gómez

Página  
2/5

Documentación mínima buscada (sistema de clasificación seguido de los símbolos de clasificación)

A61K, A61P

Bases de datos electrónicas consultadas durante la búsqueda (nombre de la base de datos y, si es posible, términos de búsqueda utilizados)

INVENES, EPODOC, MEDLINE, PUBMED, BIOSIS, EMBASE, WPI

Fecha de Realización de la Opinión Escrita: 15.07.2011

**Declaración**

|   |                       |           |
|---|-----------------------|-----------|
| <b>Novedad (Art. 6.1 LP 11/1986)</b>            | Reivindicaciones 1-13 | <b>SI</b> |
|   | Reivindicaciones      | <b>NO</b> |
| <b>Actividad inventiva (Art. 8.1 LP11/1986)</b> | Reivindicaciones 1-13 | <b>SI</b> |
|   | Reivindicaciones      | <b>NO</b> |

Se considera que la solicitud cumple con el requisito de aplicación industrial. Este requisito fue evaluado durante la fase de examen formal y técnico de la solicitud (Artículo 31.2 Ley 11/1986).

**Base de la Opinión.-**

La presente opinión se ha realizado sobre la base de la solicitud de patente tal y como se publica.

**1. Documentos considerados.-**

A continuación se relacionan los documentos pertenecientes al estado de la técnica tomados en consideración para la realización de esta opinión.

| Documento | Número Publicación o Identificación   | Fecha Publicación |
|-----------|---|-------------------|
| D01       | ALVAREZ-LORENZO, C. y col. Tetronic micellization, gelation and drug solubilization: Influence of pH and ionic strength . European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics. Mayo 2007, Vol. 66, Nº 2, páginas 244-252 . Todo el documento.  |                   |
| D02       | CHIAPPETTA, D.A. y SOSNIK, A. Poly(ethylene oxide)-poly(propylene oxide) block copolymer micelles as drug delivery agents: Improved hydrosolubility, stability and bioavailability of drug. European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics. 2007, Vol. 66, Nº 3, páginas 303-317. Todo el documento.                                |                   |
| D03       | WO 2008154368 A2 (UNIVERSITY OF VIRGINIA PATENT FOUNDATION)   | 18.12.2008        |
| D04       | LIPPENS, E. y col. Evaluation of bone regeneration with an injectable, in situ polymerizable Pluronic F127 hydrogel derivative combined with autologous mesenchymal stem cells in a goat tibia defect model. Tissue Engineering, Part A. 2010 Febrero, Vol.16, Nº 2, páginas 617-627. Todo el documento, en especial resumen, última frase. |                   |
| D05       | JAU-WEN HUANG y col. Osteoblastic differentiation of rabbit mesenchymal stem cells loaded in a carrier system of Pluronic F127 and Interpore. Chang Gung Medical Journal. 2006, Vol. 29, Nº 4, páginas 363-372, ISSN 2072-0939. Todo el documento en especial "DISCUSSION".   |                   |

**2. Declaración motivada según los artículos 29.6 y 29.7 del Reglamento de ejecución de la Ley 11/1986, de 20 de marzo, de Patentes sobre la novedad y la actividad inventiva; citas y explicaciones en apoyo de esta declaración**

La presente invención se refiere al uso de una o varias poloxaminas para inducir la diferenciación de células mesenquimales o progenitoras en osteoblastos y por lo tanto su uso en tratamiento de defectos óseos de fracturas conminutas, fracturas asociadas a osteopenia, pseudoartrosis y pérdidas de reserva ósea. La solicitud también tiene por objeto las composiciones farmacéuticas que contienen poloxaminas como ingrediente activo, su procedimiento de preparación y al método in vitro para inducir la diferenciación de células mesenquimales o progenitoras en osteoblastos.

Del contenido de la descripción de la solicitud se interpreta que el uso de las poloxaminas en el tratamiento de defectos óseos como fracturas, osteopenia, pseudoartrosis es consecuencia de la capacidad de osteoinducción de las poloxaminas. Por lo tanto se llama la atención al solicitante sobre relación de dependencia que debe existir entre las reivindicaciones 2, 3, 4 y 5 con la reivindicación independiente 1.

Los documentos D01 y D02 describen la utilización de poloxaminas como agentes solubilizantes, estabilizantes y que mejoran la liberación y biodisponibilidad de fármacos.

El documento D03 tiene por objeto un método de tratamiento de una herida o enfermedad caracterizada por una disminución del flujo sanguíneo que comprende la aplicación tópica de una composición farmacéutica que comprende un copolímero como poloxamer, meroxapol o poloxamina y opcionalmente al menos un agente terapéutico adicional. A pesar de que se enumeran varias poloxaminas, en los ejemplos el único copolímero tensoactivo utilizado es Poloxamer- 188.

El documento D03 evalúa el papel en la regeneración ósea de un defecto tibial de un derivado de Pluronic® F127, polimerizable in situ, combinado con células madre autólogas.

El documento D04 estudia la diferenciación osteoblástica de células madre de conejo cargadas en una matriz de Interpore con Pluronic® F127.

No se ha encontrado divulgado en el estado de la técnica el uso de una o varias poloxaminas para inducir la diferenciación de células mesenquimales o progenitoras en osteoblastos, las composiciones farmacéuticas de las mismas, su procedimiento de preparación o el método in vitro para inducir la diferenciación de células mesenquimales o progenitoras en osteoblastos.

Por lo tanto se considera que la invención recogida en las reivindicaciones 1 a 13 de la presente solicitud tiene novedad e implica actividad inventiva (Art. 6.1 y 8.1. LP 11/1986).