

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 384 273**

51 Int. Cl.:
A61K 35/32 (2006.01)
A61K 38/39 (2006.01)
A61P 19/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 96 Número de solicitud europea: **07112740 .1**
96 Fecha de presentación: **12.12.2005**
97 Número de publicación de la solicitud: **1862170**
97 Fecha de publicación de la solicitud: **05.12.2007**

54 Título: **Formulación de esmalte con amelogenina**

30 Prioridad:
10.12.2004 SE 0403014
16.12.2004 US 636686 P

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
03.07.2012

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
03.07.2012

73 Titular/es:
STRAUMANN HOLDING AG
PETER MERIAN-WEG 12
4002 BASEL, CH

72 Inventor/es:
Lyngstadaas, S. Petter y
Molenberg, Aaldert

74 Agente/Representante:
de Elzaburu Márquez, Alberto

ES 2 384 273 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

Formulación de esmalte con amelogenina

CAMPO DE LA INVENCION

5 La presente invención se refiere a una nueva y mejorada formulación de baja concentración de una sustancia del esmalte activa, tal como una matriz del esmalte, derivado de la matriz del esmalte y/o una proteína de la matriz del esmalte que comprende al menos un fragmento de amelogenina, destinada a usarse como una formulación farmacéutica o terapéutica. En la presente invención, dicha sustancia del esmalte activa se incorpora a la matriz polimérica, en particular destinada para usar en reparación, regeneración y/o remodelado tisular, para inducir la unión entre partes de tejido mineralizado vivo, para unir una pieza de tejido mineralizado vivo a un sitio de unión sobre una pieza de otro tejido vivo, para mejorar la curación de una herida en la piel o mucosa, para prevenir o tratar una infección o una enfermedad inflamatoria, para la formación o regeneración de dentina, para favorecer la toma de un injerto, para tratar neoplasmas benignos derivados epitelialmente, semi-malignos o malignos, para la inducción de apoptosis, o para rellenar una cavidad de herida y/o un defecto tisular después de un procedimiento y/o trauma, tal como cirugía citorreductora.

En la presente invención, la sustancia del esmalte activa que comprende al menos un fragmento de amelogenina se puede incorporar a la matriz polimérica de manera que se libera por degradación de la matriz polimérica por acción enzimática y/o por difusión. Dicha matriz polimérica es adecuada para crecimiento interno celular, u oclusión de células.

Por tanto la invención comprende en particular una formulación farmacéutica o terapéutica de una sustancia del esmalte activa que comprende al menos un fragmento de amelogenina a una concentración total inferior en la formulación, donde una regulación espacial y/o selectiva de liberación de dicha sustancia del esmalte activa permite que se libere un mayor porcentaje de la sustancia del esmalte activa en el momento de la apropiada actividad celular.

ANTECEDENTES DE LA INVENCION

30 Las sustancias del esmalte activas de la presente invención (la expresión "una sustancia del esmalte activa" se usa en el presente contexto para una matriz del esmalte, un derivado de la matriz del esmalte y/o una proteína de la matriz del esmalte que comprenden al menos un fragmento de amelogenina), pueden inducir no solamente uno, sino una cascada organizada de factores, encontrados naturalmente en tejidos que se desarrollan adyacentes a la matriz del esmalte. Mimetizan el medio natural de un tejido en desarrollo y por tanto mimetizan un estímulo natural para la regeneración tisular, diferenciación y/o maduración celular.

Las proteínas de la matriz del esmalte, presentes en la matriz del esmalte, son la mayor parte muy conocidas como precursoras del esmalte. Antes de la formación del cemento, las proteínas de la matriz del esmalte se depositan sobre la superficie de la raíz en el extremo apical de la raíz dental en desarrollo. Hay evidencia de que la matriz del esmalte depositada es el factor iniciador para la formación de cemento. Nuevamente, la formación de cemento en sí misma está asociada al desarrollo del ligamento periodontal y hueso alveolar. Como se ha demostrado por los presentes inventores antes de la presente invención, las proteínas de la matriz del esmalte pueden, por tanto, potenciar la regeneración periodontal mediante la imitación del desarrollo de la fijación natural en el diente (Gestrelus S, Lyngstadaas SP, Hammarström L. Regeneración periodontal con Emdogain basada en el biomimetismo. Clin Oral Invest 4:120-125 (2000)).

La matriz del esmalte está compuesta por un número de proteínas, tales como amelogeninas, enamelina, proteína de penachos del esmalte, proteasas, y albúmina. Las amelogeninas, el constituyente mayoritario de la matriz del esmalte, son una familia de proteínas hidrofóbicas derivadas de un solo gen mediante corte y empalme alternativo y proceso post-secretor controlado. Están muy conservadas a lo largo de la evolución de los vertebrados y presentan un alto nivel de homología secuencial entre todos los vertebrados superiores examinados (aproximadamente 80%). De hecho, las secuencias del gen transcrito de amelogenina de porcino y humana difieren solamente en 4% de las bases. Por tanto, las proteínas de la matriz del esmalte, aunque de origen porcino, se consideran "propias" cuando se encuentran en el cuerpo humano y pueden potenciar la regeneración dental en humanos sin desencadenar respuestas alérgicas u otras reacciones no deseadas.

Los derivados de la matriz del esmalte (por ejemplo EMD), en forma de un purificado extracto ácido de proteínas de la matriz del esmalte de porcino, se han usado previamente con éxito para restablecer el ligamento periodontal funcional, cemento y hueso alveolar en pacientes con grave pérdida de fijación dental (Hammarström et al., 1997, Journal of Clinical Periodontology 24, 658-668).

Además, en estudios sobre células del ligamento periodontal cultivadas (PDL) se demostró que la velocidad de fijación, crecimiento y metabolismo de estas células aumentó significativamente cuando estuvieron presentes EMD en los cultivos. También, las células expuestas a EMD mostraron mayor señalización por cAMP intracelular y producción autocrina de factores de crecimiento en comparación con los controles. Por otra parte las células

epiteliales, aunque aumentaba la señalización por cAMP y secreción de factores de crecimiento cuando estaban presentes los EMD, fueron inhibidas tanto en la proliferación como en el crecimiento (Lyngstadaas et al., 2001, Journal of Clinical Periodontology 28, 181-188).

5 En la literatura de patentes se ha descrito previamente que proteínas de la matriz del esmalte y derivados de la matriz del esmalte (EMD) son capaces de inducir la formación de tejido duro (por ejemplo, formación de esmalte, patente de US No. 4.672.032 (Slavkin)), apoyar la unión entre tejidos duros (EP-B-0 337 967 y EP-B-0 263 086), favorecer la curación de heridas abiertas tales como de piel y mucosa, tener un efecto beneficioso en el tratamiento de enfermedades infecciosas e inflamatorias (EPO 1, 1059934 y EPO II, 01201915.4), inducir la regeneración de la dentina (WO 01/97834), facilitar la toma de un injerto (WO 00/53197), inducir apoptosis en el tratamiento de neoplasmas (WO 00/53196), y facilitar el relleno de una cavidad de herida y/o defecto tisular después de un procedimiento y/o trauma, tal como una cirugía citorreductora (WO 02/080994).

15 Para la reparación o regeneración tisular, como se ejemplifica en las indicaciones médicas para EMD descritas anteriormente, las células deben migrar a un lecho de herida, proliferar, diferenciarse, y formar una configuración tisular final. Poblaciones de células múltiples deben participar frecuentemente en esta respuesta morfogénica.

20 Sin embargo, cualquiera de los efectos o usos descritos anteriormente de sustancias del esmalte activas, tales como la matriz del esmalte, derivados de la matriz del esmalte y/o proteínas de la matriz del esmalte, han sido documentados para formulaciones de sustancia del esmalte activas a concentraciones relativamente altas. Siendo una concentración típica entre 10-30 mg/ml.

25 Se ha demostrado que la baja concentración de EMP o amelogenina es eficaz en modelos *in vitro*, a 1 mg/ml, sin embargo todos los experimentos *in vivo* sobre pacientes reales se realizaron con dosificaciones que variaban desde 3 mg/ml a 30 mg/ml. (ver www.molnlycke.com/Files/XelmaResources/Full_report.pdf).

30 Ningún efecto ha podido observarse hasta ahora con formulaciones de sustancia del esmalte activas a concentraciones inferiores. Sin desear limitar la presente invención a una teoría específica, esto es potencialmente debido al hecho de que todas las formulaciones farmacéuticas y/o cosméticas usadas hasta ahora se han destinado a liberar la sustancia del esmalte activa de una manera incontrolada.

35 Análogamente, para poder bajar la dosificación de factor de crecimiento de fibroblastos básico administrado, se diseñaron dispositivos de liberación controlada basados en el uso de heparina inmovilizada para secuestrar el factor de crecimiento. Por ejemplo, Edelman et al. (Biomaterials 1991 September; 12(7):619-26) usaron perlas de SEPHAROSE™ conjugada con heparina dentro de alginato. Las perlas sirvieron como depósitos que liberaban factor de crecimiento de fibroblastos básico ("bFGF") lentamente, basado en la unión y disociación de bFGF con heparina.

40 Se ha demostrado también que péptidos con bi-dominios, que contienen una secuencia sustrato de factor XIIIa y una secuencia peptídica bioactiva, se pueden entrecruzar en geles de fibrina y que el péptido bioactivo retiene su actividad celular *in vitro* (Schense, J. C., et al. (1999) *Bioconj. Chem.* 10:75-81).

45 Además, en los documentos US 2003/0187232 y US 2003/0166833 se demostró la incorporación de proteínas de factores de crecimiento íntegras en matrices de proteínas o polisacáridos basada en la unión de heparina a una matriz por métodos covalentes o no-covalentes, para formar una matriz de heparina. Después la heparina enlazó no-covalentemente factores de crecimiento con afinidad por la heparina a la matriz proteica. También se demostró que una proteína de fusión contenía una región reticulante tal como un sustrato de factor XIIIa y la secuencia proteica nativa. Se postuló que la incorporación de enlaces degradables entre la matriz y los factores bioactivos es particularmente útil para liberación duradera de fármacos.

50 La presente solicitud se refiere a los efectos beneficiosos de una formulación nueva y mejorada de sustancias del esmalte activas, aplicable a todos los usos médicos, terapéuticos y cosméticos mencionados anteriormente, donde dicha sustancia del esmalte activa que comprende al menos un fragmento de amelogenina se incorpora a una matriz proteica, matriz sintética y/o matriz polisacáridica, análogas a las matrices mostradas en los documentos US 2003/0187232 y US 2003/0166833, que incluyen combinaciones de dos o más de las matrices anteriores, de manera que la sustancia del esmalte activa se libera por degradación de la matriz y/o por acción enzimática y/o difusión, por tanto reduciendo efectivamente la dosis total necesaria en la formulación y facilitando una regulación espacial de liberación, lo que permite que se libere un mayor porcentaje de la sustancia del esmalte activa en el momento apropiado de la actividad celular.

60 **DESCRIPCION DE LA INVENCION**

65 La presente invención revela por primera vez una formulación farmacéutica o terapéutica de baja concentración para administrar una sustancia del esmalte activa, que comprende una matriz polimérica que puede ser adecuada para el crecimiento o crecimiento interno celular, o ser oclusiva de células, y al menos una sustancia del esmalte activa que comprende al menos un fragmento de amelogenina, donde la concentración de dicha sustancia del esmalte activa

en la formulación no es mayor que 1 mg/ml, tal como aproximadamente 1 mg, o menor que 1 mg/ml, tal como menor que 750 µg/ml, 500 µg/ml, 250 µg/ml, 150 µg/ml, 100 µg/ml, 50 µg/ml, 25 µg/ml, 20 µg/ml, 10 µg/ml, 5 µg/ml, o 1 µg/ml.

5 La presente invención proporciona productos y métodos para reparación, regeneración, o remodelación de tejidos duros y blandos, en particular para crecimiento óseo y dental, usando matrices poliméricas naturales y/o sintéticas que tienen una sustancia del esmalte activa, que comprende al menos un fragmento de amelogenina, incorporada o encerrada en ellas de modo que se puede liberar. Las matrices poliméricas son biocompatibles y/o biodegradables. Se pueden formar *in vitro* o *in vivo* en el momento de la implantación. Una matriz polimérica típica es adecuada para crecimiento o crecimiento interno celular, o ser oclusiva de células, dependiendo del tamaño de los poros de la matriz. La sustancia del esmalte activa se puede incorporar, fijar y/o incluir en las matrices poliméricas, reteniendo no obstante su bioactividad completa. Más aún, la sustancia del esmalte activa se puede incorporar, fijar y/o incluir de modo que se puede liberar usando técnicas que proporcionan control sobre el momento de liberación y/o el grado en el que la sustancia del esmalte activa es liberada. Tal formulación se puede usar por ejemplo directamente o indirectamente para reparación tisular, usando la matriz polimérica como un vehículo de liberación controlada.

Las formulaciones que comprenden las sustancias del esmalte activas descritas antes de la presente invención se administran muy habitualmente a concentraciones sustancialmente mayores que las concentraciones previstas en el presente documento, tales como a concentración de al menos 30 mg/ml de dicha sustancia del esmalte activa. Más aún, se ha establecido en este campo que las formulaciones que comprenden menos de 5 mg de proteína/ml son de hecho insuficientes, como se documenta en el ejemplo 1 para EMD, que se formula en un gel convencional de PGA.

Como se documenta de modo convincente en los ejemplos, los inventores pudieron demostrar sorprendentemente que la nueva formulación de baja concentración que comprende una matriz polimérica y una sustancia del esmalte activa, que comprende al menos un fragmento de amelogenina, permite una reducción de la concentración necesaria de la sustancia del esmalte activa a entre 1 µg/ml y 1 mg/ml, tal como entre 100 µg/ml y 500 µg/ml, 50 µg/ml y 250 µg/ml, 50 µg/ml y 150 µg/ml, 10 µg/ml y 200 µg/ml, 10 µg/ml y 100 µg/ml, 5 µg/ml y 100 µg/ml, 1 µg/ml y 50 µg/ml, o incluso menos.

La matriz polimérica relacionada con la presente invención está formada por moléculas precursoras que se reticular en una red polimérica iónicamente, covalentemente, o por combinación de ambos modos, o por hinchamiento de uno o más material(es) polimérico(s), o por ligaduras físicas, por ejemplo por puntos de reticulación formados a través de agregación de bloques extremos a través de diferencias de fase o solubilidad. En una primera realización de la presente invención, dicha matriz forma una red polimérica que tiene suficiente espaciado inter-polímero para permitir crecimiento, crecimiento interno y/o migración de células en la matriz. Típicamente, en esta realización particular, la matriz polimérica reticulada forma un gel. En una segunda realización de la presente invención, dicha matriz forma una red polimérica con un tamaño de poro estrecho, que ocluye el crecimiento interno y/o migración de células a la matriz y que es suficientemente estrecho para restringir la sustancia del esmalte activa dentro de la matriz. Además, aún en otra realización, dicha segunda realización puede degradarse en el tiempo para contener suficiente espaciado inter-polímero para permitir crecimiento, crecimiento interno y/o migración de células a la matriz.

Las dos realizaciones específicas de la presente invención anteriormente descritas sirven a fines específicos y diferentes, y por tanto son alternativamente preferibles dependiendo del pretendido uso de la formulación de baja concentración de las sustancias del esmalte activas que comprenden al menos un fragmento de amelogenina. Por ejemplo, se puede preferir una forma de matriz oclusiva de células cuando la intención de uso es proporcionar una barrera biodegradable que impide al tejido blando circundante interactuar con la región a proteger, lo que evitará por ejemplo la infección de una herida. En otro ejemplo se prefiere especialmente esta forma cuando se busca una función de barrera durante el tiempo de curación completa para la regeneración eficaz del hueso, tal como en un defecto de lecho del implante. Tal realización puede tomar la forma de una membrana. Además, tal matriz preferida se puede diseñar, por ejemplo, para incluir sitios predestinados para degradación enzimática o hidrolítica, y por tanto con el tiempo se vuelve invasiva a las células. Por otra parte, si por ejemplo una herida de tejido blando o una cavidad de herida resultante de cirugía citorreductora se ha de rellenar con una formulación de baja concentración que comprende una sustancia del esmalte activa que comprende al menos un fragmento de amelogenina, el crecimiento interno y/o migración celular es beneficioso para la curación de dicha herida, y así típicamente se prefiere una formulación en gel que tiene un tamaño de poro que es suficientemente grande para permitir crecimiento interno y/o migración celular. Nuevamente, los geles típicos de PEG no siempre comienzan con tamaños de poro que son suficientemente grandes para permitir crecimiento interno y/o migración celular, pero se pueden diseñar en el tiempo, por ejemplo tras la degradación enzimática por enzimas liberadas por invasión o células adyacentes, o por degradación hidrolítica o mecánica para contener tamaños de poro suficientemente grandes para permitir crecimiento interno y/o migración celular. También, en algunas aplicaciones, dichas dos formas específicas podrían ser intercambiables, o usadas conjuntamente.

En una realización, la matriz polimérica está formada por proteínas, preferiblemente proteínas presentes naturalmente en el paciente en el que se ha de implantar la matriz polimérica. Una proteína natural de matriz

polimérica especialmente preferida es la fibrina, aunque se pueden usar también matrices poliméricas producidas a partir de otras proteínas, tales como colágeno y gelatina. Se pueden usar también polisacáridos y glicoproteínas para formar la matriz polimérica.

- 5 En otra realización también preferida se usan polímeros sintéticos para formar la matriz polimérica que se reticulan por enlace iónico o covalente o físico.

10 El material de la matriz polimérica es preferiblemente biodegradable por enzimas naturalmente presentes o por hidrólisis. Además la velocidad de degradación se puede manipular por el grado de reticulación y la inclusión de inhibidores de proteasas en la matriz polimérica. Los sitios degradables permiten más liberación específica de la sustancia del esmalte activa de las matrices. Por ejemplo, la degradación basada en actividad enzimática permite la liberación de una sustancia del esmalte activa, que comprende al menos un fragmento de amelogenina, para ser controlada por un proceso celular tal como proteólisis localizada más que por difusión de la sustancia del esmalte activa a través del gel. El sitio o enlace degradable se escinde por enzimas liberadas por células que invaden la matriz polimérica o que la circundan. Esto permite a las sustancias del esmalte activas, que comprenden al menos un fragmento de amelogenina, ser liberadas a diferentes velocidades dentro del mismo material dependiendo de la localización de las células dentro del/adyacentes al material.

20 La actividad proteolítica específica celular es, por ejemplo, vital en las aplicaciones que transcurren durante largos periodos de tiempo. Una liberación controlada de la sustancia del esmalte activa que comprende al menos un fragmento de amelogenina como se ha descrito en este documento, reduce eficazmente la cantidad de sustancia del esmalte activa total necesaria, puesto que su liberación está controlada por procesos celulares. La conservación de la sustancia del esmalte activa y su biodisponibilidad son ventajas distintas de explotar la actividad proteolítica específica celular respecto al uso de dispositivos de liberación controlada por difusión que característicamente da por resultado la pérdida de una cantidad significativa de sustancia del esmalte activa en un arranque inicial de liberación.

DESCRIPCION DETALLADA

30 Sustancias del esmalte activas

La matriz del esmalte es un precursor del esmalte y se puede obtener a partir de cualquier fuente natural relevante, es decir, un mamífero en el que los dientes están en desarrollo. Una fuente adecuada es desarrollar dientes a partir de animales sacrificados tales como, por ejemplo, terneros, cerdos o corderos. Otra fuente es, por ejemplo, la piel de pescado. En el presente contexto, la expresión "sustancia del esmalte activa" se usa para abarcar la matriz del esmalte, derivados de la matriz del esmalte y/o proteínas de la matriz del esmalte no discriminantes de su fuente.

40 La matriz del esmalte se puede preparar a partir de dientes en desarrollo como se ha descrito previamente (EP-B-0 337 967 y EP-B-0 263 086). La matriz del esmalte se recoge por raspado y los derivados de la matriz del esmalte se preparan, por ejemplo, por extracción con disolución acuosa tal como un tampón, un ácido o base diluidos, o una mezcla de agua/disolvente, seguido por exclusión de tamaños, desalado u otras etapas de purificación, seguido alternativamente por liofilización. Alternativamente las enzimas se pueden desactivar por tratamiento con calor o disolventes, en cuyo caso los derivados se pueden almacenar en forma líquida sin liofilización.

45 Como una fuente alternativa de los derivados o proteínas de la matriz del esmalte se pueden usar también rutas sintéticas generalmente aplicables, muy conocidas por el profesional, o usar células eucariotas y/o procariotas cultivadas modificadas por técnicas de DNA. Por tanto las proteínas de la matriz del esmalte pueden ser de origen recombinante y/o sintético (ver, por ejemplo, Sambrook, J. et al.: Molecular Cloning, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989).

50 Así, un aspecto de la presente invención se refiere a una formulación farmacéutica y/o terapéutica para administrar una sustancia del esmalte activa, que comprende una matriz polimérica y al menos una proteína recombinante o sintética seleccionada del grupo de sustancia del esmalte activas que comprenden al menos un fragmento de amelogenina, que se pueden modificar químicamente. En una realización preferida, dicha proteína tiene al menos un residuo de cisteína que está situado en el N-terminal, o C-terminal, de dicha proteína.

60 En el presente contexto, los derivados de la matriz del esmalte son derivados de la matriz del esmalte que incluyen una o varias proteínas de la matriz del esmalte, que comprenden al menos un fragmento de amelogenina, o partes o fragmentos de tales proteínas producidas naturalmente por empalme o proceso alternos, o por escisión enzimática o química de una proteína de longitud natural, o por síntesis de polipéptidos *in vitro* o *in vivo* (por ejemplo, métodos de DNA recombinante y/o cultivo de células diploides). Los derivados de proteínas de la matriz del esmalte incluyen también polipéptidos o proteínas relacionadas con la matriz del esmalte que comprenden al menos un fragmento de amelogenina. Los polipéptidos o proteínas se pueden unir a una adecuada molécula vehículo biodegradable tal como ácidos poliamínicos o polisacáridos, o sus combinaciones. Además, la expresión derivados de la matriz del esmalte abarca también sustancias análogas sintéticas que comprenden al menos un fragmento de amelogenina.

Las proteínas son macromoléculas biológicas constituidas por residuos aminoacídicos unidos conjuntamente por enlaces peptídicos. Las proteínas, como polímeros lineales de aminoácidos, se llaman también polipéptidos. Típicamente, las proteínas tienen 50-800 residuos aminoacídicos y por tanto tienen pesos moleculares en el intervalo de desde aproximadamente 6.000 hasta aproximadamente varios centenares de miles de Dalton o más. Las proteínas pequeñas se llaman péptidos u oligopéptidos.

Las proteínas de la matriz del esmalte son proteínas que normalmente están presentes en la matriz del esmalte, es decir, el precursor del esmalte (Ten Cate: Oral Histology, 1994; Robinson: Eur. J. Oral Science, Jan. 1998, 106 Suppl. 1:282-91), o proteínas, péptidos o fragmentos de tales proteínas que se pueden obtener por escisión de tales proteínas. En general, tales proteínas tienen un peso molecular por debajo de 120.000 Dalton e incluyen amelogeninas, no-amelogeninas, no-amelogeninas ricas en prolina y tuftelinas.

Los ejemplos de proteínas para usar de acuerdo con la invención son amelogeninas, fragmentos y sus derivados, y sus mezclas. Una preparación que contiene una sustancia del esmalte activa para usar de acuerdo con la invención puede contener también al menos dos de las sustancias proteínicas mencionadas anteriormente. Además, algunas de las proteínas para usar de acuerdo con la invención se encuentran en el producto comercializado EMDOGAIN® (BIORA AB, Suecia).

EMDOGAIN® (BIORA AB, S-205 12 Malmö, Suecia), un derivado de la matriz del esmalte muy conocido en la técnica, contiene 30 mg de proteína de la matriz del esmalte, calentada durante 3 horas a aproximadamente 80°C con el fin de inactivar proteasas residuales, por 1 ml de Disolución Vehículo (Alginato de Propilenglicol), que se mezclan antes de la aplicación a menos que la proteína y el vehículo se prueben por separado. La relación en peso es aproximadamente 80/8/12 entre los principales picos proteicos a 20, 14, y 5 kDa, respectivamente.

En general, las proteínas mayoritarias de una matriz del esmalte se conocen como amelogeninas. Estas constituyen aproximadamente 90% peso/peso de las proteínas de la matriz. El 10% peso/peso restante incluye no-amelogeninas ricas en prolina, tuftelina, proteínas de penachos del esmalte, proteínas de suero y al menos una proteína salivar; sin embargo también pueden estar presentes otras proteínas tales como, por ejemplo, amelina (ameloblastina, sheathlina) que se han identificado en asociación con la matriz del esmalte. Además, las diversas proteínas se pueden sintetizar y/o procesar en varios tamaños diferentes (es decir, diferentes pesos moleculares). Así, se ha descubierto que las proteínas dominantes en la matriz del esmalte, amelogeninas, existen en varios tamaños diferentes que forman conjuntamente agregados supramoleculares. Ellas son sustancias notablemente hidrofóbicas que bajo condiciones fisiológicas forman agregados. Pueden llevar o ser vehículos de otras proteínas o péptidos. El tamaño de los agregados es variable, que comprende una media de tamaño entre aproximadamente 10 nm y 100 µm, 100 nm-10 µm, o 50 nm-1 µm, frecuentemente mayores, tales como entre 100 nm-100 µm, 20 nm-100 µm, 25 nm-100 µm, 50 nm-100 µm, 10-100 nm, 10-25 nm, 100-50 nm, 20-30nm, 20-50 nm, 20-60 nm, 25-45 nm, 25 nm-50 nm, 25 nm-75 nm, 50 nm-75 nm, etc. En general, el tamaño de los agregados puede ser variable, dependiendo también de la concentración de proteínas, péptidos y/o fragmentos en una disolución/matriz dada y de la presencia de otras sustancias en la matriz.

Por tanto la invención se refiere a una formulación farmacéutica o terapéutica que comprende una amelogenina, y/o al menos un fragmento y/o un sub-fragmento de una amelogenina.

Otra realización también preferida se refiere además a una formulación farmacéutica o terapéutica que comprende una pre-pro amelogenina.

También se consideran que son adecuadas otras sustancias proteicas/polipeptídicas para usar de acuerdo con la presente invención. Los ejemplos incluyen proteínas o fragmentos de proteínas tales como proteínas ricas en prolina y poli(prolina).

Otros ejemplos de sustancias que se consideran adecuadas para usar de acuerdo con la presente invención son los agregados de tales proteínas, de derivados de la matriz del esmalte y/o de proteínas de la matriz del esmalte así como metabolitos de la matriz del esmalte, de derivados de la matriz del esmalte y proteínas de la matriz del esmalte. Los metabolitos pueden ser de cualquier tamaño, que varía desde el tamaño de las proteínas hasta el de péptidos cortos.

Las proteínas, polipéptidos, péptidos y/o sub-fragmentos de ellos, relacionados con esta invención, pueden estar en una forma sustancialmente aislada o purificada. Se entenderá que las proteínas, polipéptidos, péptidos y/o sub-fragmentos de ellos se pueden mezclar con vehículos o diluyentes, que no interferirán con el pretendido fin de las proteínas, polipéptidos, y/o sub-fragmentos de ellos y que sin embargo se considerarán como sustancialmente aislados. Tal forma sustancialmente purificada comprenderá generalmente la proteína, péptido y/o fragmento de ellos en una preparación en la que más del 90%, por ejemplo 95%, 96%, 97%, 98% ó 99% de la proteína de la preparación es una proteína, polipéptido, péptido y/o fragmento de la invención.

Además, cualquier secuencia aminoacídica que es al menos 70% idéntica, tal como ser al menos 72%, 75%, 77%, 80%, 82%, 85%, 87%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% ó 99% idéntica a la secuencia

aminoacídica de una proteína, polipéptido, péptido y/o sub-fragmento de una sustancia del esmalte activa que comprende al menos un fragmento de amelogenina de acuerdo con la invención, se considera también que está dentro del alcance de la presente invención.

5 Por una proteína, polipéptido, péptido y/o fragmento de ellos que tiene una secuencia aminoacídica al menos 95%, por ejemplo, idéntica a una secuencia aminoacídica de referencia, se entiende que la secuencia aminoacídica de por ejemplo el polipéptido es idéntica a la secuencia de referencia excepto que la secuencia aminoacídica puede incluir hasta 5 mutaciones puntuales por cada 100 aminoácidos de la secuencia aminoacídica de referencia. En otras palabras, para obtener un polipéptido que tiene una secuencia aminoacídica al menos 95% idéntica a una secuencia aminoacídica de referencia: hasta 5% de los aminoácidos de la secuencia de referencia se pueden suprimir o sustituir con otro aminoácido, o un número de aminoácidos de hasta 5% de los aminoácidos totales de la secuencia de referencia se puede insertar en la secuencia de referencia. Estas mutaciones de la secuencia de referencia pueden ocurrir en las posiciones amino- o carboxi-terminales de la secuencia aminoacídica de referencia o en cualquier sitio entre las posiciones terminales, esparcidas individualmente entre aminoácidos de la secuencia de referencia o en uno o más grupos contiguos dentro de la secuencia de referencia.

En la presente invención, un programa de algoritmos locales es muy adecuado para determinar la identidad. Los programas de algoritmos locales (tales como Smith-Waterman) comparan una subsecuencia de una secuencia con una subsecuencia de una segunda secuencia, y encuentran la combinación de subsecuencias y el alineamiento de esas subsecuencias que produce la mayor puntuación de similitud global. Los huecos internos, si se permiten, se penalizan. Los algoritmos locales funcionan bien para comparar dos proteínas multidominios que tienen un solo dominio o solo un sitio de unión en común.

Los métodos para determinar la identidad y similitud están codificados en programas públicamente disponibles. Los métodos preferidos de programas de ordenador para determinar la identidad y similitud entre dos secuencias incluyen, pero no están limitados a, el paquete de programas GCG (Devereux, J et al. (1994)) BLASTP, BLASTN, y FASTA (Altschul, S.F. et al. (1990)). El programa BLASTX está públicamente disponible en el NCBI y otras fuentes (BLAST Manual, Altschul, S.F. et al., Altschul, S. F. et al (1990)). Cada programa de análisis de secuencias tiene una matriz de puntuación por defecto y unas penalizaciones de los huecos por defecto. En general, se esperaría que un biólogo molecular use los ajustes por defecto establecidos por el programa informático usado.

Las proteínas de una matriz del esmalte se pueden dividir en una parte de alto peso molecular y un parte de bajo peso molecular, y se ha descubierto que una fracción bien definida de las proteínas de la matriz del esmalte tiene propiedades valiosas con respecto al tratamiento de defectos periodontales (es decir, heridas periodontales). Esta fracción contiene proteínas extraíbles con ácido acético llamadas generalmente amelogeninas y constituye la parte de bajo peso molecular de una matriz del esmalte (cf. EP-B-0 337 967 y EP-B-0 263 086).

La parte de bajo peso molecular de una matriz del esmalte tiene una actividad adecuada para inducir unión entre tejidos duros en defectos periodontales. Sin embargo, en el presente contexto las proteínas activas no están restringidas a la parte de bajo peso molecular de una matriz del esmalte. Actualmente, las proteínas preferidas incluyen proteínas de la matriz del esmalte tales como amelogeninas con pesos moleculares (medidos in vitro con SDS-PAGE) por debajo de 60.000 Dalton aproximadamente, pero las proteínas que tienen un peso molecular superior a 60.000 Dalton tienen también propiedades prometedoras como candidatos para, por ejemplo, favorecer el crecimiento de tejido conectivo.

Como se ha mencionado anteriormente, las proteínas, polipéptidos o péptidos para usar de acuerdo con la invención tienen típicamente un peso molecular de a lo sumo 120 kDa aproximadamente, tal como, por ejemplo, a lo sumo 100 kDa, 90 kDa, 80 kDa, 70 kDa ó 60 kDa determinados por electroforesis SDS PAGE.

Una preparación de una sustancia del esmalte activa para usar de acuerdo con la invención puede contener también una mezcla de sustancias del esmalte activas, que comprenden al menos un fragmento de amelogenina, con pesos moleculares diferentes.

En consecuencia se considera que la sustancia del esmalte activa, que comprende al menos un fragmento de amelogenina, para usar de acuerdo con la invención tiene un peso molecular de hasta aproximadamente 40.000 tal como, por ejemplo, un peso molecular de entre aproximadamente 5.000 y aproximadamente 25.000.

Separando las proteínas, por ejemplo por precipitación, cromatografía de intercambio iónico, electroforesis preparativa, cromatografía de filtración en gel, cromatografía en fase reversa o cromatografía de afinidad, se pueden purificar amelogeninas de diferentes pesos moleculares.

Se puede variar la combinación de pesos moleculares de amelogeninas, desde un compuesto dominante de 20 kDa hasta un agregado de amelogeninas con muchos pesos moleculares diferentes entre 40 y 5 kDa, y hasta un compuesto dominante de 5 kDa. Otras proteínas de la matriz del esmalte tales como la tufelina o enzimas proteolíticas presentes normalmente en la matriz del esmalte se pueden añadir y ser transportadas por el agregado de amelogenina.

En general, la matriz del esmalte, derivados de la matriz del esmalte y proteínas de la matriz del esmalte son sustancias hidrofóbicas, es decir, menos solubles en agua especialmente a elevadas temperaturas. Típicamente, estas proteínas son solubles a valores de pH no fisiológicos y a una temperatura baja tal como 4-20°C aproximadamente, aunque ellas se agregarán y precipitarán a la temperatura corporal (35-37°C) y pH neutro.

En una realización específicamente preferida, una formulación de baja concentración de sustancia del esmalte activas para usar de acuerdo con la presente invención comprende por tanto sustancias del esmalte activas, que comprenden al menos un fragmento de amelogenina, que están agregadas al menos parcialmente, y/o que tras la aplicación *in vivo* son capaces de formar agregados. El tamaño de partícula de dichos agregados está en un intervalo de desde aproximadamente 200 µm a aproximadamente 10 µm, tal como entre 100 µm y 10 nm, 10 µm y 100 nm, 1 µm y 20 nm, 1 µm y 10 nm, 5 µm y 10 nm, 10 µm y 1 nm, 100 µm y 10 nm, 100 µm y 1 nm, 1 µm y 1 nm, 1 µm y 5 nm, 1 µm y 15 nm.

Como la matriz polimérica relacionada con la presente invención se forma reticulando moléculas precursoras en una red polimérica, dicha matriz puede formar una red polimérica que tiene espaciado inter-polímero suficientemente estrecho para permitir el confinamiento de agregados de sustancia del esmalte activas, que comprenden al menos un fragmento de amelogenina, dentro de la matriz. En una realización actualmente preferida, tal red polimérica con tamaños de poro suficientemente estrechos se formará a un pH neutro, y/o *in situ* tras la aplicación de las moléculas precursoras en el cuerpo del paciente, provocando así automáticamente la agregación y/o precipitación de las sustancias del esmalte activas.

De acuerdo con la presente invención, una sustancia del esmalte activa que comprende al menos un fragmento de amelogenina se puede usar junto con otras sustancias farmacológicas activas tales como, por ejemplo, sustancias antibacterianas, antiinflamatorias, antivirales, antifúngicas o en combinación con quimioterapia local, inductores de apoptosis, factores de crecimiento tales como por ejemplo TGFβ, PDGF, IGF, FGF, EGF, factor de crecimiento de queratinocitos o sus análogos peptídicos. También se pueden usar enzimas - inherentemente presentes en la matriz del esmalte o su preparación, o añadidas - en combinación con una matriz del esmalte, derivado de la matriz del esmalte y/o proteína de la matriz del esmalte, especialmente proteasas.

Dependiendo del uso de la sustancia del esmalte activa que comprende al menos un fragmento de amelogenina, una composición puede ser una composición farmacéutica y/o terapéutica, o cosmética. En adelante la expresión "composición farmacéutica y/o terapéutica" se entiende también que abarca composiciones cosméticas así como composiciones pertenecientes a la denominada área gris entre productos farmacéuticos y cosméticos, a saber, productos cosmeceúticos.

Una composición farmacéutica y/o terapéutica que comprende una sustancia del esmalte activa, que comprende al menos un fragmento de amelogenina, sirve como un sistema de liberación de fármaco. En el presente contexto, la expresión "sistema de liberación de fármaco" indica una composición farmacéutica y/o terapéutica (una formulación farmacéutica y/o terapéutica o una forma de dosificación) que por administración presenta la sustancia activa al cuerpo de un humano o un animal.

Aparte de la sustancia del esmalte activa, que comprende al menos un fragmento de amelogenina, y de la matriz polimérica, una composición farmacéutica y/o terapéutica para usar de acuerdo con la invención puede por supuesto comprender también excipientes adicionales farmacéutica y cosméticamente aceptables.

Un excipiente farmacéutica o cosméticamente aceptable se define actualmente como una sustancia que es sustancialmente inofensiva al individuo al que se ha de administrar la composición. Tal excipiente cumple con los requisitos dados por las autoridades nacionales de la salud. Las farmacopeas oficiales tales como por ejemplo la farmacopea británica, la farmacopea de los Estados Unidos de América y la farmacopea europea establecen patrones para excipientes farmacéuticamente aceptables.

La elección de excipiente(s) farmacéuticamente aceptable(s) en una composición para usar de acuerdo con la invención y su concentración óptima no se puede predecir generalmente y se debe determinar sobre la base de una evaluación experimental de la composición final. Sin embargo, un profesional en formulación farmacéutica y/o terapéutica puede encontrar orientación en por ejemplo "Remington's Pharmaceutical Sciences", 18th Edition, Mack Publishing Company, Easton, 1990.

Matrices de Fibrina

La fibrina es una material natural que se ha descrito para varias aplicaciones biomédicas. La fibrina se ha descrito como material para matrices de crecimiento interior celular en la patente de U.S. No. 6.331.422 de Hubbell et al. Los geles de fibrina se han usado anteriormente como selladores a causa de su capacidad para unirse a muchos tejidos y de su papel natural en la curación de heridas. Algunas aplicaciones específicas incluyen el uso como un sellador para fijación de injertos vasculares, fijación de válvulas cardíacas, colocación de huesos en fracturas y reparación de tendones (Sierra, D. J., Journal of Biomaterials Applications, 7:309-352 (1993)). Además, estos geles se han usado

como dispositivos para liberación de fármacos, y para regeneración neuronal (Williams, et al., Journal of Comparative Neurobiology, 264:284-290 (1987)).

Se han caracterizado los procedimientos por los que el fibrinógeno se polimeriza en fibrina. Inicialmente, una proteasa escinde la molécula dímica de fibrinógeno en los dos sitios simétricos. Hay varias proteasas posibles que pueden escindir el fibrinógeno, que incluyen trombina, reptilasa, y proteasa III, y cada una actúa en la proteína en un sitio diferente (Francis, et al., Blood Cells, 19:291-307, 1993). Una vez que se escinde el fibrinógeno, ocurre una etapa de autopolimerización en la que los monómeros de fibrinógeno se reúnen y forman un gel polimérico reticulado no-covalentemente (Sierra, 1993). Este autoensamble sucede porque los sitios de unión llegan a exponerse después de ocurrir la escisión por proteasas. Una vez que están expuestos, estos sitios de unión en el centro de la molécula se pueden unir a otros sitios de las cadenas de fibrinógeno que están presentes en los extremos de las cadenas peptídicas (Stryer, L. en Biochemistry, W. H. Freeman & Company, NY, 1975). De esta manera se forma una red polimérica. El factor XIIIa, una transglutaminasa activada a partir del factor XIII por proteólisis de trombina, puede entonces reticular covalentemente la red polimérica. Existen otras transglutaminasas y también se pueden implicar en la reticulación covalente y empalme a la red de fibrina.

Una vez que se forma un gel de fibrina reticulada, la degradación subsiguiente está firmemente controlada. Una de las moléculas clave en el control de la degradación de fibrina es el inhibidor de plasmina α_2 (Aoki, N., Progress in Cardiovascular Disease, 21:267-286, 1979). Esta molécula actúa por reticulación a la cadena α de fibrina a través de la acción del factor XIIIa (Sakata, et al., Journal of Clinical Investigation, 65:290-297, 1980). Uniéndose al gel, una alta concentración de inhibidor puede estar localizada en el gel. El inhibidor actúa entonces impidiendo la unión de plasminógeno a fibrina (Aoki, et al., Thrombosis and Haemostasis, 39:22-31, 1978) e inactivando la plasmina (Aoki, 1979). El inhibidor de plasmina α_2 contiene un sustrato de glutamina. La secuencia exacta se ha identificado como NQEQVSPL (NO ID SEC: 12), con la primera glutamina que es el aminoácido activo para la reticulación.

Se ha demostrado que péptidos con bi-dominios, que contienen una secuencia sustrato del factor XIIIa y una secuencia peptídica bioactiva, se pueden reticular en geles de fibrina y que este péptido bioactivo retiene su actividad celular in vitro (Schense, J.C., et al. (1999) Bioconj. Chem. 10:75-81).

Una formulación farmacéutica y/o terapéutica preferida de la presente invención comprende por tanto una matriz polimérica que es adecuada para crecimiento o crecimiento interno celular, o es oclusiva de células, y al menos una proteína seleccionada del grupo de sustancias del esmalte activas, que comprenden al menos un fragmento de amelogenina, donde la concentración de dicha sustancia del esmalte activa no es mayor de 1 mg/ml de formulación, y donde la matriz polimérica comprende fibrina. En dicha formulación farmacéutica y/o terapéutica, una sustancia del esmalte activa de acuerdo con la presente invención se puede acoplar a un dominio sustrato de transglutaminasas, tal como una secuencia sustrato del factor XIIIa.

Esta secuencia sustrato del factor XIIIa puede incluir, por ejemplo, GAKDV, KKKK, o NQEQVSPL. El acoplamiento entre la sustancia del esmalte activa, que comprende al menos un fragmento de amelogenina, y el dominio sustrato de transglutaminasas puede realizarse por síntesis química.

Alternativamente, el dominio sustrato de transglutaminasas puede ser un sustrato para una transglutaminasa distinta del factor XIIIa. El dominio de sustrato del factor XIIIa más preferido tiene una secuencia aminoacídica de NQEQVSPL, pero también otras proteínas que reconocen las transglutaminasas, tales como la fibronectina, se pudieron acoplar al péptido sustrato de transglutaminasas.

Tabla 1

Dominios sustrato de transglutaminasas

YRGDTIGEGQQHHLGG	Un péptido con glutamina en el sitio de acoplamiento de transglutaminasas en la cadena de fibrinógeno
GAKDV	Un péptido que mimetiza el sitio de acoplamiento de lisina en la cadena de fibrinógeno
KKKK	Un péptido con una poli(lisina) en un sitio de acoplamiento al azar
NQEQVSPL	Un péptido que mimetiza el sitio de reticulación en el inhibidor de plasmina α_2 (abreviado con TG).

Matrices Sintéticas

Las reacciones de reticulación para formar matrices sintéticas para aplicación en el cuerpo incluyen (i) polimerización por radicales libres entre dos o más precursores que contienen dobles enlaces insaturados, como se

describe en Hern et al., J. Biomed. Mater. Res. 39:266-276 (1998), (ii) reacción de sustitución nucleofílica tal como por ejemplo entre un precursor que incluye un grupo amina y un precursor que incluye un grupo succinimidilo como se describe en la patente de U.S. No. 5.874.500 de Rhee et al., (iii) reacciones de condensación y adición y (iv) reacción de adición de tipo Michael entre un nucleófilo fuerte y un grupo o enlace insaturado conjugado (como un electrófilo fuerte). Especialmente preferida es la reacción entre una molécula precursora que tiene un grupo tiol o amina como grupo nucleofílico y moléculas precursoras que incluyen grupos acrilato o vinilsulfona como grupos electrofílicos. El más preferido como grupo nucleofílico es el grupo tiol. Las reacciones de adición de tipo Michael están descritas en el documento WO 00/44808 (Hubbell et al.). Las reacciones de adición de tipo Michael permiten reticulación *in situ* de al menos un primer y un segundo componente precursor bajo condiciones fisiológicas de una manera autoselectiva, incluso en presencia de materiales biológicos sensibles. Cuando uno de los componentes precursores tiene una funcionalidad de al menos dos, y al menos uno de los otros componentes precursores tiene una funcionalidad mayor que dos, el sistema reaccionará autoselectivamente para formar un biomaterial tridimensional reticulado.

En consecuencia, un aspecto de la presente invención se refiere a una formulación farmacéutica y/o terapéutica para administrar una sustancia del esmalte activa que comprende una matriz polimérica adecuada para crecimiento, crecimiento interno y/o migración celular, o que es oclusiva de células, y una sustancia del esmalte activa que comprende al menos un fragmento de amelogenina, donde dicha matriz se forma por una reacción de adición nucleofílica entre un nucleófilo fuerte y un enlace insaturado conjugado, o un grupo insaturado conjugado.

Preferiblemente, los grupos insaturados conjugados o enlaces insaturados conjugados son acrilatos, vinilsulfonas, metacrilatos, acrilamidas, metacrilamidas, acilonitrilos, vinilsulfonas, 2- ó 4-vinilpiridinio, maleimidias, o quinonas.

Los grupos nucleofílicos son preferiblemente grupos tiol, grupos amino o grupos hidroxilo. Los grupos tiol son sustancialmente más reactivos que los grupos amino no protonados. El pH es importante en esta consideración: el grupo tiol desprotonado es sustancialmente más reactivo que el tiol protonado. Por tanto, las reacciones de adición que implican una insaturación conjugada, tal como un acrilato o una quinona, con un tiol para convertir dos componentes precursores en una matriz polimérica se realizará frecuentemente mejor lo más rápidamente y autoselectivamente a un pH de aproximadamente 8. A pH de aproximadamente 8, un número significativo de los tioles de interés están desprotonados (y por tanto más reactivos) y la mayor parte de las aminas de interés están sin embargo protonadas (y por tanto menos reactivas). Cuando un tiol se usa como la primera molécula precursora, es muy deseable una estructura conjugada que es selectiva en su reactividad con el tiol en comparación con las aminas.

Las primeras y segundas moléculas precursoras adecuadas incluyen proteínas, péptidos, polioxilalquilenos, poli(alcohol vinílico), poli(etileno-co-alcohol vinílico), poli(ácido acrílico), poli(etileno-co-ácido acrílico), poli(etiloxazolina), poli(vinilpirrolidona), poli(etileno-co-vinilpirrolidona), poli(ácido maleico), poli(etileno-co-ácido maleico), poli(acrilamida), y copolímeros de bloques de poli(óxido de etileno)-co-d(óxido de propileno). Una molécula precursora especialmente preferida es poli(etilenglicol).

El poli(etilenglicol) (PEG) proporciona un bloque componente conveniente. Se pueden comprar o sintetizar fácilmente PEGs lineales (que significan con dos extremos) o ramificados (que significan con más de dos extremos) y después funcionalizar los grupos extremos de los PEG para introducir un nucleófilo fuerte, tal como un tiol, o una estructura conjugada tal como un acrilato o una vinilsulfona. Cuando estos componentes se mezclan unos con otros o con un componente correspondiente en un medio ligeramente básico, se formará una matriz por reacción entre el primer y segundo componente precursor. Un componente de PEG puede reaccionar con un componente no-PEG, y el peso molecular o carácter hidrofílico de cualquier componente se puede controlar para manipular las características mecánicas, la permeabilidad, y el contenido de agua del biomaterial resultante.

Una realización especialmente preferida de la presente invención es, por tanto, una formulación farmacéutica y/o terapéutica para administrar una sustancia del esmalte activa, que comprende una matriz polimérica, que puede ser adecuada para crecimiento interno y/o migración celular, o ser oclusiva de células, y una sustancia del esmalte activa que comprende al menos un fragmento de amelogenina, donde la concentración de dicha sustancia del esmalte activa es menor que 1 mg/ml de formulación y donde dicha matriz comprende poli(etilenglicol).

Como un ejemplo, es fácil sintetizar péptidos que contienen dos o más residuos de cisteína, y después este componente puede actuar fácilmente como el primer componente precursor con grupos nucleofílicos. Por ejemplo, un péptido con dos residuos de cisteína libres formará fácilmente una matriz cuando se mezcla con un PEG-tri-vinilsulfona (un PEG que tiene tres brazos con vinilsulfonas en cada uno de sus brazos) a pH fisiológico o ligeramente superior (por ejemplo, 8 ó 9). También la gelificación se puede realizar bien a pH incluso mayor, pero a expensas de la potencial autoselectividad. Cuando los dos componentes precursores líquidos, es decir, los componentes precursores disueltos, se mezclan conjuntamente, reaccionan durante un periodo de varios segundos a varios minutos para formar un gel elástico que consiste en una red de cadenas de PEG, que llevan los nódulos de la red, con los péptidos como enlaces conectores. Los péptidos se pueden seleccionar como sustratos de proteasas para hacer a la red capaz de ser infiltrada y degradada por las células, como se realiza en una red basada en proteínas, tal como en una matriz de fibrina. Preferiblemente las secuencias de los dominios son sustratos para las

enzimas que están implicadas en la migración celular (como, por ejemplo, sustratos para enzimas tales como colagenasa, plasmina, metaloproteinasa (MMP) o elastasa), aunque los dominios adecuados no están limitados a estas secuencias. Una secuencia particularmente útil es un sustrato para la enzima plasmina. Las características de degradación de los geles se puede manipular cambiando los detalles del péptido que sirve como nódulos de reticulación. Se puede producir un gel que es degradable por colagenasa, pero no por plasmina, o por plasmina, pero no por colagenasa. Además, es posible hacer que el gel se degrade más rápida o lentamente en respuesta a tal enzima, simplemente cambiando la secuencia aminoacídica para alterar la K_m o k_{cat} , o ambas, de la reacción enzimática. Así, se puede producir un biomaterial que es biomimético en que es capaz de ser remodelado por las características de remodelación normales de las células, por ejemplo, muestra sitios de sustrato para la importante proteasa plasmina. La gelificación de los PEG con el péptido es autoselectiva.

Opcionalmente, se pueden incorporar a la matriz agentes biofuncionales para proporcionar enlace químico a otras especies (por ejemplo, una superficie tisular). Tener sustratos de proteasas incorporados en la matriz es importante cuando la matriz está formada a partir de PEG-vinilsulfona. Aparte de las matrices formadas a partir de PEG-acrilatos y PEG-tioles, las matrices formadas a partir de PEG-vinilsulfonas y PEG-tioles no contienen enlaces degradables por hidrólisis. Por tanto, la incorporación de sustratos de proteasas permite a la matriz degradarse en el cuerpo.

Las matrices sintéticas son operativamente fáciles de formar. Se mezclan dos precursores líquidos; un precursor contiene una molécula precursora con grupos nucleofílicos y la otra molécula precursora contiene los grupos electrofílicos. Como disolvente puede servir disolución salina fisiológica. Se genera por reacción calor mínimo. Por tanto, la gelificación se puede realizar *in vivo* o *in vitro*, en contacto directo con el tejido, sin toxicidad perjudicial. Así, se pueden usar polímeros distintos de PEG, modificados telequímicamente o modificados en sus grupos laterales.

En consecuencia, la presente invención se refiere a una formulación farmacéutica y/o terapéutica para administrar una sustancia del esmalte activa, que comprende una matriz polimérica y una sustancia del esmalte activa que comprende al menos un fragmento de amelogenina, donde la concentración de dicha sustancia del esmalte activa es menor que 1 mg/ml de formulación, donde dicha matriz está preformada, o donde dicha matriz se forma *in situ*.

En un aspecto específico de la presente invención, se forma una microcápsula que tiene una concha externa de una matriz de PEG y un núcleo interior que comprende sustancias del esmalte activas agregadas, que comprenden al menos un fragmento de amelogenina. La microcápsula se forma cuando se usa un pH en un intervalo entre pH 5 y pH 9,5 durante la polimerización de PEG en una mezcla que comprende PEG y sustancias del esmalte activas. La concha de microcápsula está formada por PEG polimerizado, que incluye agregados de sustancias del esmalte activas. Los agregados de sustancia del esmalte activa se forman por el pH en un intervalo de entre pH 5 y pH 0,5, usado para polimerización. Los agregados de sustancias del esmalte activas son demasiado grandes para penetrar en los poros de la concha de matriz de PEG. En consecuencia, las sustancias del esmalte activas no se liberan desde la microcápsula hasta que se destruye la concha de matriz de PEG.

Para la mayor parte de las indicaciones para curación, la velocidad de crecimiento interno celular o migración de células a la matriz en combinación con una velocidad de degradación adaptada de la matriz es crucial para la respuesta global de curación. El potencial de que las matrices no degradables por hidrólisis lleguen a ser invadidas por células es principalmente una función de la densidad de la red. Si el espacio existente entre puntos o nódulos de ramificación es demasiado pequeño con relación al tamaño de las células, o si es demasiado lenta la velocidad de degradación de la matriz que da por resultado crear más espacio dentro de la matriz, se observará una respuesta de curación muy limitada. Se sabe que las matrices de curación encontradas en la naturaleza, como por ejemplo las matrices de fibrina, que se forman como una respuesta a daño en el cuerpo, consisten en una red muy poco compacta que puede ser invadida muy fácilmente por células. La infiltración está facilitada por ligandos para adhesión celular que son una parte integrada de la red de fibrina.

Las matrices producidas a partir de moléculas precursoras sintéticas hidrofílicas, como poli(etilenglicol), se hinchan en medio acuoso tras la formación de la red polimérica. Con el fin de conseguir un tiempo de gelificación suficientemente corto (entre 3 a 10 minutos a un pH de entre 7 a 8 y una temperatura en un intervalo de 36 a 38°C) y la reacción cuantitativa durante la formación *in-situ* de la matriz en el cuerpo, la concentración de partida de las moléculas precursoras debe ser suficientemente alta. Bajo tales condiciones, las concentraciones de partida necesarias conducían a matrices demasiado densas para la infiltración celular cuando la matriz no es degradable en medio acuoso. Por tanto el hinchamiento de la red polimérica es importante para agrandar y extender el espacio entre los puntos de ramificación.

Independientemente de la concentración de partida de las moléculas precursoras, los hidrogeles producidos a partir de las mismas moléculas precursoras sintéticas tales como una PEG-vinilsulfona de cuatro brazos y un péptido con grupos SH, se hinchan al mismo contenido de agua en estado de equilibrio. Esto significa que cuanto mayor es la concentración de partida de las moléculas precursoras mayor es el volumen final del hidrogel cuando alcanza su estado de equilibrio. Si el espacio disponible en el cuerpo es demasiado pequeño para permitir suficiente hinchamiento y en particular si el enlace formado a partir de los componentes precursores no es degradable por hidrólisis, la velocidad de infiltración celular y la respuesta de curación disminuirán. En consecuencia, se debe

encontrar lo óptimo entre dos requisitos contradictorios para aplicación en el cuerpo. Se ha observado buena infiltración celular y subsiguientes respuestas de curación con una red polimérica tridimensional formada a partir de la reacción de un polímero ramificado trifuncional con al menos tres brazos sustancialmente similares en peso molecular y una segunda molécula precursora que es al menos una molécula bifuncional. La relación de peso equivalente de los grupos funcionales de la primera y segunda molécula precursora es entre 0,9 y 1,1. Los pesos moleculares de los brazos de la primera molécula precursora, el peso molecular de la segunda molécula precursora y la funcionalidad de los puntos de ramificación se seleccionan de modo que el contenido de agua de la red polimérica resultante es entre el % en peso en equilibrio y 92% en peso del peso total de la red polimérica tras la terminación de la absorción de agua. Preferiblemente el contenido de agua es entre 93 y 95% en peso del peso total de la red polimérica y del agua tras la terminación de la absorción de agua. La terminación de la absorción de agua se puede conseguir cuando se alcanza la concentración en equilibrio o cuando el espacio disponible en el biomaterial no permite más aumento de volumen. Por tanto se prefiere elegir que las concentraciones de partida de los componentes precursores sean lo más bajas posible. Esto es cierto para todas las matrices hinchables, pero en particular para aquellas matrices que sufren degradación mediada por células y no contienen enlaces degradables por hidrólisis en la red polimérica.

El equilibrio entre el tiempo de gelificación y la baja concentración de partida, en particular para geles no degradables por hidrólisis, se debe optimizar sobre la base de la estructura de las moléculas precursoras. En particular, el peso molecular de los brazos de la primera molécula precursora, el peso molecular de la segunda molécula precursora y el grado de ramificación, es decir, la funcionalidad de los puntos de ramificación, se deben ajustar en consecuencia. El mecanismo de reacción real tiene una influencia pequeña en esta interacción.

Si la primera molécula precursora es un polímero de tres o cuatro brazos con un grupo funcional en el extremo de cada brazo y si la segunda molécula precursora es una molécula lineal bifuncional, preferiblemente un péptido que contiene al menos dos grupos de cisteína, entonces el peso molecular de los brazos de la primera molécula precursora y el peso molecular de la segunda molécula precursora se eligen preferiblemente de manera que los eslabones entre los puntos de ramificación tras la formación de la red tienen un peso molecular en el intervalo de entre 10 a 13 kDa (bajo las condiciones de que los eslabones son lineales, no ramificados), preferiblemente entre 11 y 12 kDa. Esto permite una concentración de partida de la suma de la primera y segunda molécula precursora en un intervalo de entre 8 a 12% en peso, preferiblemente entre 9 y 10% en peso del peso total de la primera y segunda molécula precursora en disolución (antes de la formación de la red). En el caso en que el grado de ramificación del primer componente precursor aumente a ocho y la segunda molécula precursora sea sin embargo una molécula lineal bifuncional, el peso molecular de los eslabones entre los puntos de ramificación aumenta preferiblemente a un peso molecular de entre 18 a 24 kDa. En el caso en que el grado de ramificación de la segunda molécula precursora aumente de lineal a un componente precursor de tres o cuatro brazos, el peso molecular, es decir, la longitud de los eslabones aumenta en consecuencia.

En una realización preferida de la presente invención, se elige una composición que incluye como primera molécula precursora un polímero de 15 kDa trifuncional de tres brazos, es decir, teniendo cada brazo un peso molecular de 5 kDa y como segunda molécula precursora una molécula lineal bifuncional de un peso molecular en el intervalo de entre 0,5 y 1,5 kDa, incluso más preferiblemente alrededor de 1 kDa. Preferiblemente el primer y segundo componente precursor es un poli(etilenglicol).

En otra realización preferida, el primer componente precursor incluye como grupos funcionales grupos o enlaces insaturados conjugados, los más preferidos un acrilato o una vinilsulfona, y los grupos funcionales de la segunda molécula precursora incluyen un grupo nucleofílico, preferiblemente un grupo tiol o grupos amino.

Aún en otra realización preferida de la presente invención, la primera molécula precursora es un polímero de 20 kDa de cuatro brazos (cada brazo tiene un peso molecular de 5 kDa), que tiene grupos funcionales en el final de cada brazo y la segunda molécula precursora es una molécula lineal bifuncional de un peso molecular en el intervalo de entre 1 a 3 kDa, preferido entre 1,5 y 2 kDa. Preferiblemente la primera molécula precursora es un poli(etilenglicol) que tiene grupos vinilsulfona y la segunda molécula precursora es un péptido que tiene grupos cisteína. En ambas realizaciones preferidas, la concentración de partida de la suma de la primera y segunda molécula precursora varía desde 8 hasta 11% en peso, preferiblemente entre 9 y 10% en peso del peso total de la primera y segunda molécula precursora y del agua (antes de la formación de la red polimérica), preferiblemente entre 5 y 8% en peso para conseguir un tiempo de gelificación inferior a 10 minutos. Estas composiciones tienen un tiempo de gelificación a pH 8,0 y 37°C de aproximadamente 1-10 minutos, tal como entre 2-10 minutos, o 3-10 minutos tras la mezcla.

Se describen geles sintéticos adecuados, por ejemplo en el documento WO 03/052091. Un tal ejemplo es un gel degradable enzimáticamente formado a partir de un PEG ramificado de cuatro brazos, funcionalizado con cuatro grupos vinilsulfona finales, y el péptido ditiólico de la secuencia Gly-Cys-Arg-Asp-(Gly-Pro-Gln-Gly-Ile-Trp-Gly-Gln)-Asp-Arg-Cys-Gly. Otro ejemplo del documento WO 03/052091 es un gel degradable por hidrólisis, formado mezclando un poli(etilenglicol) acrilatado (MW 15.000) de cuatro brazos con un poli(etilenglicol) lineal ditiólico (MW 3400), uniéndose covalentemente uno a otro mediante una reacción de tipo Michael.

5 Cuando la matriz contiene enlaces degradables por hidrólisis, formados por ejemplo por la reacción preferida entre acrilatos y tioles, la densidad de red respecto a la infiltración celular es especialmente importante al principio, pero en medio acuoso los enlaces se hidrolizarán y la red se volverá menos compacta, para permitir la infiltración celular. Con un aumento del grado de ramificación global de la red polimérica el peso molecular de los inter-eslabones, es decir, la longitud de los eslabones debe aumentar.

10 En una realización específica de la presente invención una formulación de baja concentración que comprende una sustancia del esmalte activa, que comprende al menos un fragmento de amelogenina, y una matriz polimérica que es oclusiva de células se obtiene por reacción de al menos dos precursores en presencia de agua. Dicha formulación se prefiere especialmente para favorecer la formación de hueso en un sitio de implante, por ejemplo en un tratamiento muy conocido en la técnica como "Regeneración Guiada de Hueso". Aquí, el sitio donde se desea la formación de hueso está separado del tejido circundante por una barrera que inhibe a las células de tejidos blandos no-osteogénicas de entrar en el sitio, permitiendo así a las células de la médula ósea rellenarlo. La matriz polimérica de acuerdo con la presente invención que forma tal membrana se obtiene por una reacción de dos o más precursores, donde los puntos de cruce adyacentes de una cadena de precursores están conectados por una cadena que tiene menos de 10000 átomos, tal como menos de 5000, 1000, 900, 800, 750 átomos, o incluso más preferido, menos de 670 átomos, por ejemplo entre 250-350 átomos, por ejemplo 300 átomos.

20 En detalle, un primer precursor comprende un núcleo que lleva 2 o más cadenas con un grupo terminal insaturado conjugado o un enlace terminal insaturado conjugado. El núcleo puede ser un solo átomo tal como un átomo de carbono o de nitrógeno, o una molécula pequeña tal como una unidad de óxido de etileno, un azúcar, un alcohol multifuncional tal como un penta-eritritol, glicerina u oligoglicerina tal como hexaglicerina. Las cadenas son polímeros lineales o cadenas de alquilo lineales o ramificadas, que comprenden opcionalmente heteroátomos, grupos amida o grupos éster. Además de las cadenas, el núcleo puede además ser sustituido con residuos alquilo lineales o ramificados o polímeros que no tienen grupos o enlaces insaturados conjugados terminales. En una realización actualmente preferida, el primer precursor tiene 2 a 10 cadenas, lo más preferiblemente 2 a 6, ó 4 a 8 cadenas. Los enlaces insaturados conjugados terminales son preferiblemente maleimida, acrilatos, acrilamidas, quininas, y 2- ó 4-vinilpiridínios. En una realización también preferida el primer precursor tiene 2 a 10 cadenas, lo más preferiblemente 3 a 8 cadenas, tal como 3 a 6 cadenas.

30 Un segundo precursor comprende un núcleo portador de 2 ó más cadenas que tienen cada una un grupo tiol unido a cualquiera de los últimos 20 átomos en el extremo de la cadena. Por ejemplo, un residuo de cisteína se puede incorporar a la cadena. Preferiblemente, el grupo tiol es terminal. El núcleo puede ser un solo átomo, tal como un átomo de carbono o de nitrógeno, o una molécula pequeña tal como una unidad de óxido de etileno, un azúcar, un alcohol multifuncional tal como un pentaeritritol, glicerina u oligoglicerina tal como una hexaglicerina. Las cadenas son polímeros lineales, o cadenas alquílicas lineales o ramificadas que comprenden opcionalmente heteroátomos, grupos amida o grupos éster. Además de las cadenas, el núcleo puede además ser sustituido con residuos alquilo lineales o ramificados, o polímeros, que no tienen grupos o enlaces insaturados conjugados terminales. En una realización preferida, el segundo precursor tiene 2 a 10 cadenas, lo más preferiblemente 2 a 6, ó 4 a 8 cadenas. En una realización también preferida, el segundo precursor tiene 2 a 10 cadenas, lo más preferiblemente 3 a 8 cadenas, tal como 3 a 6 cadenas. La suma de las cadenas del primer y segundo precursor es mayor o igual a 5, tal como mayor o igual a 6, preferiblemente mayor o igual a 8, para obtener una red tridimensional densa.

45 Cada núcleo de los precursores forma un punto de cruce. Los puntos de cruce adyacentes están conectados por una cadena que tiene menos de 10000 átomos, tal como menos de 5000, 1000, 900, 800, 750 átomos, o incluso más preferido, menos de 670 átomos, por ejemplo entre 250-350 átomos, por ejemplo 300 átomos, donde dichos átomos son solamente los átomos que están en la cadena principal de la cadena, que significa no contar los sustituyentes o átomos de hidrógeno. Preferiblemente, el número de átomos entre dos puntos de cruce adyacentes es menor que aproximadamente 330 átomos, lo más preferiblemente entre 30 y 120 átomos. Es decir, las mallas de la red tridimensional resultante son varios órdenes de magnitud menores que las dimensiones de una célula (1-100 μm) y también menores que los agregados formados por las sustancias del esmalte activas a pH neutro, que pueden ser por ejemplo de entre 10 nm y 100 μm y serían retenidos.

50 En una realización actualmente preferida de la presente invención las mallas de la red son por tanto de entre 10 nm-10 μm , es decir, los poros son más pequeños que, o no mayores que aproximadamente 1 μm en promedio, tal como menores que 500 nm, 400 nm, 300 nm, 250 nm, 200 nm, 100 nm, 75 nm, 50 nm, 10 nm. Preferiblemente los tamaños de los poros se seleccionan para que sean de entre 10 μm y 10 nm, tales como entre 10 μm y 100 nm, 10 μm y 10 nm, 1 μm y 100 nm, 500 nm y 10 nm, 500 nm y 250 nm, 50 nm y 10 nm etc.

60 **Incorporación de la sustancia del esmalte activa en la matriz polimérica**

65 Otra realización también preferida de la presente invención se refiere particularmente a una formulación farmacéutica y/o terapéutica de baja concentración para administrar una sustancia del esmalte activa, que comprende una matriz polimérica y una sustancia del esmalte activa, que comprende al menos un fragmento de amelogenina, unida a dicha matriz por enlace covalente o no covalente. En particular, dicha sustancia del esmalte

activa se puede unir a dicha matriz debido a una reacción de adición nucleofílica de al menos un residuo de cisteína de dicha sustancia del esmalte activa, que puede ser una proteína, polipéptido o subfragmento de ellos, a un grupo insaturado de al menos uno de los componentes de la matriz, estando sustituido dicho al menos un residuo de cisteína en el C-terminal o N-terminal de dicha proteína, polipéptido o subfragmento de ellos. Esta realización es especialmente preferida cuando dicha matriz polimérica forma una red polimérica que tiene suficiente espaciado inter-polímero para permitir el crecimiento, crecimiento interno y/o migración de células a la matriz. Típicamente, en esta realización particular la matriz polimérica reticulada forma un gel.

Así, para la incorporación de una sustancia del esmalte activa que comprende al menos un fragmento de amelogenina a una matriz formada a partir de componentes precursores, se puede sintetizar un péptido de fusión de sustancia del esmalte activa, o cualquier otro péptido a incorporar, o alterarlo químicamente para comprender al menos un grupo de cisteína (-SH) adicional como dominio de sustrato reticulable. El grupo de cisteína libre reacciona después con el grupo insaturado conjugado del componente precursor en una reacción de adición tipo Michael. El grupo tiol de la cisteína puede reaccionar con un enlace insaturado conjugado en el polímero sintético para formar un enlace covalente.

En una realización, dicha sustancia del esmalte activa que comprende al menos un fragmento de amelogenina se modificará por tanto químicamente para comprender al menos un grupo adicional de cisteína (-SH).

La cisteína se puede unir directamente a la sustancia del esmalte activa que comprende al menos un fragmento de amelogenina o unirse a una secuencia enlazante, que puede además incluir una secuencia aminoácida degradable enzimáticamente tal como una secuencia para degradación proteolítica, o un sustrato para degradación polisacáridica y/o una secuencia degradable por plasmina, o una secuencia que es degradable por hidrólisis no específica tal como un enlace éster, de manera que la sustancia del esmalte activa se puede escindir de la matriz por, por ejemplo, enzimas sustancialmente en la forma nativa.

Enlaces Degradables

En general, la liberación controlada de la sustancia del esmalte activa de la formulación farmacéutica y/o terapéutica de la presente invención reduce la cantidad del total de sustancia del esmalte activa necesaria. En particular, este efecto se optimiza incluso cuando su liberación está controlada por procesos celulares. La conservación de sustancia del esmalte activa y su biodisponibilidad son ventajas distintas de explotar la actividad proteolítica específica respecto al uso de dispositivos de liberación controlados por difusión que característicamente dan por resultado la pérdida de una cantidad significativa de sustancia del esmalte activa en un arranque inicial de liberación.

En una posible explicación para la intensa curación de un defecto óseo con sustancia del esmalte activa que contiene al menos un fragmento de amelogenina, unida covalentemente a una matriz, se considera importante que la sustancia del esmalte activa se administre localmente a lo largo de un periodo extenso de tiempo (es decir, no justamente una sola dosis pulsada), pero de una manera continua. Esto se realiza por una degradación lenta mediante escisión enzimática o escisión hidrolítica de la matriz. De este modo la molécula se libera después mediante un efecto pseudo-pulsado que ocurre a lo largo de un periodo de tiempo continuo. Por ejemplo, cuando una célula progenitora se infiltra en la matriz, se encontrará con una molécula de sustancia del esmalte activa y puede por tanto diferenciarse en un preosteoblasto. Sin embargo, si esa particular célula no continúa liberando sustancia del esmalte activa unida de la matriz, se convertirá efectivamente en un osteoblasto y comenzará a producir matriz ósea. Finalmente, los efectos terapéuticos de la sustancia del esmalte activa están localizados en la región defectuosa y por tanto magnificada posteriormente.

Cualquiera de los monómeros, polímeros, proteínas, polipéptidos, o subfragmentos de ellos, que forman la matriz se pueden modificar mediante inclusión de enlaces degradables. Típicamente, éstos serán sitios de escisión enzimática tales como el sitio de escisión por trombina.

Además, proteínas de fusión o péptidos quimera de sustancias del esmalte activas que comprenden al menos un fragmento de amelogenina, que están reticuladas a la matriz, pueden contener un sitio degradable entre la proteína bioactiva y un primer dominio y un sitio de unión en un segundo dominio (por ejemplo una cisteína, un sustrato de factor XIIIa o dominio de unión a heparina). Estos sitios degradables pueden degradarse por hidrólisis no específica (es decir, un enlace éster) o pueden ser sustratos para degradación enzimática específica (degradación proteolítica o polisacáridica).

Los sitios de degradación permiten a la sustancia del esmalte activa ser liberada con poca o ninguna modificación en la secuencia proteica primaria, lo que puede dar por resultado mayor actividad de la sustancia del esmalte activa. Además, los sitios degradables permiten más liberación específica de la sustancia del esmalte activa de las matrices, tales como geles de fibrina. Por ejemplo, la degradación basada en actividad enzimática permite que la liberación de una sustancia del esmalte activa se controle por un proceso celular, tal como proteólisis localizada, más que por difusión de la sustancia del esmalte activa desde algunos materiales porosos. El sitio o enlace degradable se escinde por enzimas liberadas desde células que invaden la matriz. Esto permite que la sustancia del esmalte activa se libere a diferentes velocidades dentro del mismo material dependiendo de la ubicación de las

células dentro del material. La actividad proteolítica específica celular es vital en aquellas aplicaciones que transcurren durante largos periodos de tiempo.

- 5 Las enzimas que se pueden usar para degradación proteolítica son numerosas. Los sitios degradables proteolíticamente incluyen sustratos para la colagenasa, plasmina, elastasa, estromelisin, o activadores de plasminógeno. Las sustancias ejemplares se indican en la tabla 2. P1-P5 indica las posiciones 1-5 hacia el grupo amino terminal de la proteína desde el sitio donde ocurre la proteólisis. P1'-P4' indican las posiciones aminoácidas 1-4 hacia el grupo carboxilo terminal de la proteína desde el sitio donde ocurre la proteólisis.

10 **Tabla 2**
Secuencias sustrato muestra para proteasas

Proteasa	P5	P4	P3	P2	P1	P1'	P2'	P3'	P4'	Referencia
Plasmina			L	I	K	M	K	P		Takagi and Doolittle (1975) Biochem. 14:5149-5156
Plasmina			N	F	K	S	Q	L		Takai and Dolittle, 1975
Estromelisin	Ac	G	P	L	A	L	T	A	L	Smith <i>et al.</i> , (1995). J. Biol. Chem. 270:6440-6449
Estromelisin		Ac	P	F	E	L	R	A	NH ₂	Smith <i>et al.</i> , 1995
Elastasa			Z-(?)	A	A	F	A	NH ₂		Besson <i>et al.</i> , (1996) Anal. Biochem. 237:216-223
Colagenasa		G	P	L	G	I	A	G	P	Netzel-Amett <i>et al.</i> , (1991) J. Bio. Chem., 266:6747-6755
t-PA	P	H	Y	G	R	S	G	G		Coombs <i>et al.</i> , (1998) J. Bio. Chem. 273:4323-4328
u-PA	P	G	S	G	R	S	A	S	G	Coombs <i>et al.</i> , 1998

- 15 En otra realización preferida, un dominio oligoéster se pudo insertar entre el primer y segundo dominio. Esto se pudo realizar usando un oligoéster tal como oligómeros de ácido láctico.

20 El sustrato de degradación no enzimática puede consistir en cualquier enlace que sufre hidrólisis por un mecanismo catalizado por un ácido o base. Estos sustratos pueden incluir oligoésteres tales como oligómeros de ácido láctico o glicólico. La velocidad de degradación de estos materiales se puede controlar mediante la elección de oligómero.

Sustratos polisacarídicos

25 Además puede ocurrir degradación enzimática con sustratos polisacarídicos para enzimas tales como heparinasa, heparitinasa, y condroitinasa ABC. Cada una de estas enzimas tiene sustratos polisacarídicos. En virtud de la presencia de heparina en todos los sistemas de unión a heparina, el sustrato para heparinasa está ya construido en estos sistemas.

30 Por tanto también se prevé una formulación farmacéutica y/o terapéutica para administrar una sustancia del esmalte activa, que comprende una matriz polimérica y una sustancia del esmalte activa que comprende al menos un fragmento de amelogenina donde la concentración de dicha sustancia del esmalte activa es 1 mg/ml de formulación o menor, y donde dicha sustancia del esmalte activa está unida covalentemente o no covalentemente a dicha matriz mediante al menos un fragmento de unión a heparina.

35 Se puede añadir una sustancia proteolítica durante la síntesis peptídica de la sustancia quimera del esmalte activa o de la sustancia quimera del esmalte activa-heparina. La sustancia quimera del esmalte activa de unión a heparina se pudo modificar para contener una secuencia de degradación proteolítica insertando un sustrato de proteasa, tal como la secuencia para plasmina (ver por ejemplo Tabla 2), entre el sustrato del factor XIIIa y el dominio de unión a heparina. Un sustrato con una K_m alta y una k_{cat} baja se pudo usar para escisión lenta mientras se ocupaban sitios activos de la proteasa. Se pudieron usar sustratos de escisión distintos de los de la plasmina para permitir que la liberación de la sustancia del esmalte activa sea independiente de la degradación de la matriz.

45 Al mismo tiempo se pudo insertar un dominio oligoéster entre el segundo dominio tal como el sustrato del factor XIIIa y el primer dominio, que es la sustancia del esmalte activa o el dominio de unión a heparina, o también el dominio heparínico de la quimera durante la etapa de síntesis peptídica. Esto pudo realizarse usando un oligoéster tal como oligómeros de ácido láctico.

50 Un sustrato de degradación no enzimática puede consistir en cualquier enlace que sufre hidrólisis por un mecanismo catalizado por un ácido o una base. Estos sustratos pueden incluir oligoésteres tales como oligómeros de ácido láctico o glicólico. La velocidad de degradación de estos materiales se puede controlar mediante la elección de oligómero

Heparina; Péptidos de Unión a Heparina

Una matriz polimérica de acuerdo con la presente invención puede además modificarse mediante la inclusión de heparina y/o fragmentos de unión a heparina, que se unen directa o indirectamente a proteínas que se unen a la heparina. En el último caso, las proteínas pueden unirse a la heparina, que entonces está disponible para unirse a una sustancia del esmalte activa que incluye un sitio de unión a heparina, o la misma sustancia del esmalte activa puede contener una parte de heparina que está unida por ciertas sustancias del esmalte activas de unión a heparina. Estas se pueden unir al material de la matriz usando técnicas estándar como se discute con más detalle más adelante.

Una realización prevista de la presente aplicación es, por tanto, una formulación farmacéutica y/o terapéutica de baja concentración para administrar una sustancia del esmalte activa, que comprende una matriz polimérica adecuada para crecimiento o crecimiento interno, u oclusión de células, y una sustancia del esmalte activa que comprende al menos un fragmento de amelogenina, donde la concentración de dicha sustancia del esmalte activa es menor que 1 mg/ml de formulación, y donde dicha matriz está modificada mediante la inclusión de al menos una heparina y/o al menos un fragmento de unión a heparina.

En una realización preferida, la heparina se une a geles de fibrina no covalentemente usando un sistema de dos partes que consiste en un péptido quimera y heparina propiamente dicha. El péptido quimera consiste en dos dominios, un sustrato del factor XIIIa y un dominio de unión a polisacáridos. Una vez que el péptido quimera se reticula en el gel de fibrina, se une a la heparina (u otros polisacáridos) por interacciones no covalentes.

Se ha descubierto que numerosas proteínas tienen afinidad de unión a la heparina. Se pueden encontrar ejemplos en la Tabla 3 más abajo.

Tabla 3**Secuencias de unión a heparina**

Proteína	Dominio de unión a heparina	Referencia
Anti-trombina III	K(β)FAKLAARLYRKA	Tyler-Cross, R., et. Protein Science, 3: 620-627
Factor Plaquetario 4	YKKIIKKL	Zucker and Katz, (1991). Exper. Biol. Med.: 693-702
Célula Neural	KHKGRDVILKKDVR	Kallapur, et al., Adhesion Molecule (1992) J. Neurosci. Res. 33: 538-548
Fibronectina	YEKPGSPPREVVPRPCV KNNQKSEPLIGRKKT	Haugen, et al., (1992). J. Neurosci. 12: 2034-2042
bFGF (factor de crecimiento de fibroblastos básico)	KDPKRL YRSRKY	SwissPROT: P09038
aFGF (factor de crecimiento de fibroblastos ácido)	YKKPKL	SwissPROT: P05230
LPL (lipasa lipoproteica)	AKRSSKM CRKRCN	Hata, et al., J. Biol. Chem. 268: 8447-8457

En una alternativa realización prevista, la sustancia del esmalte activa muestra por sí misma afinidad por sustratos de unión que tienen afinidades de unión a heparina, tales como las sustancias ejemplificadas en la tabla 3. En tal realización, la sustancia del esmalte activa que contiene al menos un fragmento de amelogenina se une a la matriz polimérica covalentemente o no covalentemente como se ha descrito anteriormente, proporcionando así un dominio similar a la heparina para interacciones no covalentes con cualquier otra sustancia con afinidad de unión a heparina.

Sitios de Unión Celular

Las células interactúan con su entorno ambiental mediante interacciones proteína-proteína, proteína-oligosacárido y proteína-polisacárido en la superficie celular. Las proteínas de la matriz extracelular proporcionan un huésped de señales bioactivas a la célula. Se requiere que esta red densa soporte a las células, y se ha demostrado que muchas proteínas de la matriz controlan la adhesión, esparcimiento, migración y diferenciación celular (Carey, Annual Review of Physiology, 53:161-177, 1991). Algunas de las proteínas específicas que se ha demostrado que son particularmente activas incluyen laminina, vitronectina, fibronectina, fibrina, fibrinógeno y colágeno (Lander, Journal of Trends in Neurological Science, 12:189-195, 1989). Se han realizado muchos estudios de laminina, y se ha demostrado que la laminina juega un papel vital en el desarrollo y regeneración de nervios *in vivo* y células nerviosas *in vitro* (Williams, Neurochemical Research, 12:851-869, 1987), así como en la angiogénesis.

Se han identificado algunas de las secuencias específicas que interactúan directamente con receptores celulares y causan adhesión, dispersión o transducción de señales.

Se ha demostrado que la laminina, una gran proteína de multidominios (Martin, Annual Review of Cellular Biology, 3:57-85, 1987), consiste en tres cadenas con varios dominios de unión al receptor. Estos dominios de unión al receptor incluyen la secuencia YIGSR de la cadena B1 de laminina (Graf, et al., Cell, 48:989-996, 1987; Kleinman, et al., Archives of Biochemistry and Biophysics, 272:39-45, 1989; and Massia, et al., J. of Biol. Chem., 268:8053-8059, 1993), LRGDN de la cadena A de laminina (Ignatius, et al., J. of Cell Biology, 111:709-720, 1990) y PDGSR de la cadena B1 de laminina (Kleinman, et al., 1989). También se han identificado otras varias secuencias de reconocimiento para células. Estas incluyen IKVAV de la cadena A de laminina (Tashiro, et al., J. of Biol. Chem., 264:16174-16182, 1989) y la secuencia RNIAEIKDI de la cadena B2 de laminina (Liesi, et al., FEBS Letters, 244:141-148, 1989).

En una adicional realización preferida, se incorporan a la matriz sitios peptídicos para adhesión celular, a saber, péptidos que se unen a receptores que favorecen la adhesión en las superficies celulares a los biomateriales de la presente invención. Tales péptidos que favorecen la adhesión se pueden seleccionar del grupo como se ha descrito anteriormente. Particularmente preferidas son la secuencia RGD de fibronectina y la secuencia YIGSR de laminina. La incorporación de sitios de unión celular es una realización particularmente preferida con matrices sintéticas, pero también se pueden incluir con matrices naturales. La incorporación se puede hacer, por ejemplo, simplemente mezclando un péptido de unión celular que contiene cisteína con la molécula precursora que incluye el grupo insaturado conjugado, tal como acrilato de PEG, PEG-acrilamida o PEG-vinilsulfona varios minutos antes de mezclar con el resto del componente precursor que incluye el grupo nucleofílico, tal como el componente precursor que contiene tiol. Si el sitio de unión celular no incluye una cisteína, puede ser sintetizado químicamente para incluir una. Durante esta primera etapa, el péptido que favorece la adhesión llegará a incorporarse en un extremo del precursor funcionalizado en modo múltiple con una insaturación conjugada; cuando el multi-tiol restante se añade al sistema se formará una red reticulada. Otra implicación importante del modo mediante el cual se preparan las redes aquí, es la eficacia de la incorporación de ligandos bioactivos colgantes tales como señales de adhesión. Esta etapa ha de ser cuantitativa, porque, por ejemplo, los ligandos no unidos (por ejemplo sitios de adhesión) pudieron inhibir la interacción de células con la matriz. La derivatización del precursor con tales oligopéptidos colgantes se realiza en una primera etapa en gran exceso estequiométrico (mínimo: 40 veces) de precursores electrofílicos de múltiples brazos respecto a los tioles y por tanto es claramente cuantitativa. Aparte de impedir la inhibición no deseada, este logro es biológicamente incluso más significativo: la conducta celular es extremadamente sensible a pequeños cambios en las densidades de ligandos, y un conocimiento preciso de los ligandos incorporados ayuda a diseñar y entender las interacciones célula-matriz. En resumen, la concentración de sitios de adhesión covalentemente enlazados a la matriz influye significativamente en la velocidad de infiltración celular. Por ejemplo, para un hidrogel dado, un intervalo de concentración de RGD se puede incorporar a la matriz que soporta crecimiento interno celular y migración celular de una manera óptima,

Una realización preferida actualmente es, por tanto, una formulación farmacéutica y/o terapéutica de baja concentración para administrar una sustancia del esmalte activa, que comprende una matriz polimérica adecuada para crecimiento o crecimiento interno celular, y una sustancia del esmalte activa que comprende al menos un fragmento de amelogenina, donde la concentración de dicha sustancia del esmalte activa es menor que 1 mg/ml de formulación, y donde dicha matriz se modifica mediante la inclusión de RGD. Ver, por ejemplo, los ejemplos 2 y 4 en la sección experimental.

Métodos de Uso

La presente invención proporciona una formulación de sustancias del esmalte activas de baja concentración para reparación, regeneración o remodelación de tejidos duros y blandos, en particular para el crecimiento óseo y dental usando matrices naturales y/o sintéticas que tienen una sustancia del esmalte activa, que comprende al menos un fragmento de amelogenina, liberable incorporada y/o incluida en ellas. Las matrices son biocompatibles y/o biodegradables y se pueden formar *in vitro* o *in vivo* en el momento de la implantación. La sustancia del esmalte activa que comprende al menos un fragmento de amelogenina se puede incorporar y/o incluir en las matrices y retiene su completa bioactividad. Más aún, como se ha esbozado anteriormente, la sustancia del esmalte activa que comprende al menos un fragmento de amelogenina puede ser liberable incorporada, usando técnicas que proporcionan control sobre cómo y cuándo y en qué grado la sustancia del esmalte activa es liberada, de manera que la matriz se puede usar para reparación de tejidos directa o indirectamente, usando la matriz como un vehículo de liberación controlada.

La nueva formulación farmacéutica y/o terapéutica de baja concentración descrita en el presente documento se puede usar para reparación, regeneración y/o remodelación de tejidos, y/o liberación de una sustancia del esmalte activa, antes del o en el momento de la implantación. En algunas realizaciones será deseable inducir reticulación en el sitio de administración para conformar la matriz al tejido en el sitio de implantación. En otras realizaciones será conveniente preparar la matriz antes de la implantación.

Se pueden añadir también células a la formulación farmacéutica y/o terapéutica antes de o en el momento de la implantación, o incluso después de la implantación, durante o después de la reticulación del polímero para formar la matriz. Esto puede ser además de la, o en lugar de la, reticulación de la matriz para producir espaciado intersticial diseñado para favorecer la proliferación o crecimiento interno celulares.

Aunque en la mayoría de los casos será deseable introducir las formulaciones farmacéuticas y/o terapéuticas para favorecer el crecimiento y proliferación celular, en algunos escenarios potenciales, las sustancias del esmalte activas se usarán para inhibir la velocidad de proliferación celular. Una aplicación específica es inhibir la formación de adhesión después de la cirugía e inhibir el crecimiento interno de fibroblastos en un lecho de herida después de la colocación de un implante.

En un aspecto particular, la nueva y mejorada formulación de baja concentración de matriz del esmalte, derivados de la matriz del esmalte y/o proteínas de la matriz del esmalte descritos en el presente documento se pretende usar como un medicamento tal como un agente terapéutico o profiláctico, en particular para usar en reparación, regeneración y/o remodelación de tejidos, para inducir la unión entre partes de tejido mineralizado vivo, para unir una pieza de tejido mineralizado vivo a un sitio de unión o una pieza de otro tejido vivo, para mejorar la curación de una herida en la piel o mucosa, para prevenir o tratar una infección o una enfermedad inflamatoria, para la formación o regeneración de dentina, para favorecer la toma de un injerto, para tratar neoplasmas benignos derivados epitelialmente, semi-malignos o malignos, para la inducción de apoptosis, o para rellenar una cavidad de herida y/o defecto tisular después de un procedimiento y/o trauma, tal como cirugía citorreductora.

En un segundo aspecto, tal formulación farmacéutica y/o terapéutica se usará para la fabricación de un medicamento para reparar tejido mineralizado tal como hueso, cartílago y dientes, para reparación tisular de tejido no mineralizado tal como tejido blando y mucosa, para el tratamiento de una enfermedad que implica inflamación y/o infección, para la formación o regeneración de dentina, para favorecer la toma de un injerto, para tratar neoplasmas benignos derivados epitelialmente, semi-malignos o malignos, para la inducción de apoptosis, o para rellenar una cavidad de herida y/o defecto tisular después de un procedimiento y/o trauma, tal como cirugía citorreductora.

Aplicando la nueva y mejorada formulación de baja concentración de matriz del esmalte, derivados de la matriz del esmalte y/o proteínas de la matriz del esmalte, descritos en el presente documento, en un modelo de dehiscencia periodontal en cerdos (ver el ejemplo 5 en la sección experimental) para la curación y regeneración de tejido periodontal, en particular para rebrote de tejido mineralizado, se descubrió sorprendentemente que la morfología de la estructura ósea regenerada era diferente de la estructura regenerada cuando se usaba derivado de la matriz del esmalte en una clásica formulación de alta concentración (30 mg/ml en PGA). Por tanto se descubrió por primera vez que la nueva formulación permite neogénesis guiada de tejido mineralizado tal como crecimiento óseo o rebrote óseo guiados en un cuerpo de mamífero.

Sin querer limitar la presente invención a una teoría científica específica, se prevé que la estructura ósea nuevamente formada se forme dentro de la formulación farmacéutica y/o terapéutica para administrar una sustancia del esmalte activa, que comprende una matriz polimérica que es adecuada para crecimiento interno y/o migración celular, y una sustancia del esmalte activa que comprende al menos un fragmento de amelogenina. Por tanto, el volumen, forma y posición de esta matriz nueva se puede usar para modelar el volumen, forma y posición de la correspondiente generación ósea, permitiendo aplicaciones nuevas y complejas de tales matrices independientemente de la concentración real de sustancia del esmalte activa en tal formulación. El profesional entenderá que dicha concentración de matriz del esmalte se puede ajustar para adaptarse mejor a cada necesidad específica.

Nuevas aplicaciones médicas y/o dentales posibles para la formulación farmacéutica y/o terapéutica para administrar una sustancia del esmalte activa de la presente invención, que comprende una matriz polimérica que es adecuada para crecimiento interno y/o migración celular, y una sustancia del esmalte activa que comprende al menos un fragmento de amelogenina, son por ejemplo tratamiento de defectos grandes o complejos en los dientes tales como defectos de furcación, o rebrote de estructuras óseas perdidas en el esqueleto, o en las articulaciones de un cuerpo de mamífero. Está previsto además que la formulación se puede usar para neogénesis ósea guiada o rebrote en una forma específica *in vivo*, *in situ*, o fuera del cuerpo de mamíferos, así como en una ubicación no terminal del cuerpo de mamíferos, con lo cual tal estructura ósea nueva pueda usarse fácilmente para implantar en el cuerpo de mamíferos.

En una realización actualmente preferida, una formulación de sustancias del esmalte activas a usar para la nueva indicación médica esbozada anteriormente, comprende poli(etilenglicol) y una concentración de dicha sustancia del esmalte activa, que comprende al menos un fragmento de amelogenina, que es menor que 1 mg/ml de formulación.

Se prevé además un estuche que comprende una formulación farmacéutica y/o terapéutica de acuerdo con la presente invención y EMDOGAIN® para una aplicación simultánea de ambas formulaciones, y el uso de tal estuche combinatorio como un medicamento.

Ventajas de formulaciones de liberación continua de la presente invención

Las formulaciones farmacéuticas y/o terapéuticas de la presente invención que comprenden una matriz polimérica y sustancias del esmalte activas, que comprenden al menos un fragmento de amelogenina, se pueden usar como formulaciones de liberación continua. La semivida biológica de las proteínas/polipéptidos es con frecuencia corta y por tanto su actividad biológica se pierde rápidamente cuando se administran al cuerpo. También, con formulaciones corrientes, en contraste con las formulaciones de liberación continua descritas en el presente documento, hay un arranque inicial de actividad de la sustancia debido a la gran cantidad de sustancia liberada inicialmente después de la administración, tras lo cual la actividad biológica disminuye con el tiempo. En cambio, usando las formulaciones farmacéuticas y/o terapéuticas de la presente invención, la liberación de las sustancias del esmalte activas se puede controlar tanto respecto al tiempo de liberación como a la concentración liberada. También, usando las formulaciones farmacéuticas y/o terapéuticas de la presente invención, la liberación de las sustancias del esmalte activas es una liberación localizada, donde la liberación ocurre de una manera controlada en el sitio corporal deseado. Las formulaciones de la presente invención también permiten liberar una cantidad regular de las sustancias del esmalte activas durante periodos prolongados de tiempo, incluso durante días y semanas si se desea. De este modo el proceso de curación de heridas es mejorado.

El tiempo durante el cual se libera la sustancia del esmalte activa y la cantidad liberada por unidad de tiempo se puede ajustar cambiando la composición de la formulación farmacéutica y/o terapéutica respecto a la concentración de polímero, grado de reticulación del polímero y sustancia activa, concentración de sustancias del esmalte activas que comprenden al menos un fragmento de amelogenina en la formulación, incorporación de sitios de escisión enzimática y otras sustancias biológicamente activas que afectan a la velocidad de degradación de la red polimérica como se ha descrito en otros lugares de este texto. De este modo el perfil de liberación se puede ajustar como se desee para cada aplicación específica.

Además, como algunas de las nuevas formulaciones descritas en el presente documento son más estables en formas que las formulaciones clásicas de los derivados de la matriz del esmalte en, por ejemplo, gel de PGA, y cuando también están destinadas a ser adecuadas para crecimiento interno celular, pueden usarse por primera vez para guiar un rebrote particular de tejido mineralizado en una forma específica, volumen y/o localización.

30 Métodos de Aplicación

En una realización, la formulación farmacéutica y/o terapéutica se gelifica *in situ* en o sobre el cuerpo. En otra realización, la composición farmacéutica y/o terapéutica se puede preformar fuera del cuerpo y después aplicarse en la configuración preformada.

Como se ha descrito anteriormente, el material de la matriz se puede fabricar a partir de componentes precursores sintéticos o naturales. Independientemente de la clase de componente precursor usado, los componentes precursores deben separarse antes de la aplicación de la mezcla al cuerpo para prevenir la combinación o contacto de uno con otro bajo condiciones que permiten la polimerización o gelificación de los componentes. Para prevenir el contacto anterior a la administración, se puede usar un estuche que separa las composiciones una de otra. Al mezclar bajo condiciones que permiten polimerización, las composiciones forman una red tridimensional suplementada con sustancias del esmalte activas. Dependiendo de los componentes precursores y sus concentraciones, puede ocurrir gelificación casi instantáneamente después de mezclar.

En una realización la matriz se forma a partir de fibrinógeno. El fibrinógeno, mediante una cascada de diversas reacciones origina geles para formar una matriz cuando se pone en contacto con trombina y una fuente de calcio a temperatura y pH apropiados. Los tres componentes, fibrinógeno, trombina y la fuente de calcio, deben almacenarse por separado. Sin embargo, siempre que al menos uno de los tres componentes se mantenga separado los otros dos componentes se pueden combinar antes de la administración. El fibrinógeno se puede disolver (que adicionalmente puede contener aprotinina para aumentar la estabilidad) en una disolución tampón a pH fisiológico (en un intervalo desde pH 6,5 a 8,0, preferiblemente desde pH 7,0 a pH 7,5) y almacenado separadamente de una disolución de trombina en un tampón de cloruro cálcico (por ejemplo, intervalo de concentración de 40 a 50 mM). La disolución tampón para el fibrinógeno puede ser una disolución tampón de histidina a una concentración preferida de 50 mM que incluye además NaCl a una concentración preferida de 150 mM o una disolución salina de tampón TRIS (preferiblemente a una concentración de 33 mM). En una realización preferida se proporciona un estuche, que contiene una sustancia del esmalte activa que comprende al menos un fragmento de amelogenina, fibrinógeno, trombina, y una fuente de calcio. Opcionalmente, el estuche puede contener una enzima reticuladora tal como factor XIIIa. Esta sustancia del esmalte activa que comprende al menos un fragmento de amelogenina puede ser una proteína de fusión que contiene un dominio bioactivo de una sustancia del esmalte activa, un dominio sustrato para una enzima reticuladora y un sitio de degradación entre el dominio sustrato y dominio bioactivo. La proteína de fusión puede estar presente en la disolución de fibrinógeno o de trombina. En una realización preferida la disolución de fibrinógeno contiene la proteína de fusión.

Las disoluciones se mezclan preferiblemente con un dispositivo de jeringas de dos vías, en el que la mezcla ocurre apretando los contenidos de ambas jeringas mediante una cámara de mezcla y/o aguja y/o mezclador estático. Otras opciones también preferidas son añadir las 2 disoluciones a un recipiente, mezclarlas en él, transferirlas a, por

ejemplo, una jeringa y aplicar después. De manera óptima, ambas disoluciones se pueden disolver en un tampón ligeramente ácido en la jeringa 1, después unirse a una jeringa con una base que contiene luer hembra (y alternativamente modificador de viscosidad) y mezclarse mediante mezcla de jeringa-hermida.

5 En una realización actualmente preferida se almacenan por separado fibrinógeno y trombina en forma liofilizada. Cualquiera de los dos puede contener la proteína de fusión. Antes de usar, el tampón tris o de histidina se añade al fibrinógeno, el tampón puede además contener aprotinina. La trombina liofilizada se disuelve en la disolución de cloruro cálcico. Posteriormente, las disoluciones de fibrinógeno y trombina se colocan en cuerpos separados de recipientes/viales/jeringa y se mezclan mediante un dispositivo conector de dos vías tal como una jeringa de dos
10 vías. Opcionalmente, los cuerpos de recipientes/viales/jeringa son bipartitos que tienen por tanto dos cámaras separadas por un separador ajustable que es perpendicular a la pared del cuerpo de jeringa. Una de las cámaras contiene el fibrinógeno o trombina liofilizados, mientras que la otra cámara contiene una disolución tampón apropiada. Cuando se presiona el émbolo, el separador se mueve y libera el tampón en la cámara de fibrinógeno para disolver el fibrinógeno. Una vez que el fibrinógeno y la trombina están disueltos, ambos cuerpos de jeringa bipartitos se unen a un dispositivo conector de dos vías y los contenidos se mezclan presionándolos mediante la
15 aguja de inyección unida al dispositivo conector. Opcionalmente el dispositivo conector contiene un mezclador estático para mejorar la mezcla de los contenidos.

20 En otra realización también preferida, el fibrinógeno se diluye ocho veces y la trombina se diluye 20 veces antes de mezclar. Esta relación da por resultado un tiempo de gelificación de aproximadamente un minuto.

En una realización más, la matriz polimérica incluida en la formulación de baja concentración de la presente invención se forma a partir de componentes precursores sintéticos capaces de sufrir una reacción de adición Michael. Puesto que el componente precursor nucleofílico (el multitíol) reacciona solamente con el componente
25 multi-aceptador (el grupo insaturado conjugado) a pH básico, los tres componentes que se han de almacenar separadamente antes de la mezcla son: la base, el componente nucleofílico y el componente multi-aceptador. Tanto el componente multi-aceptador como el componente multitíol se pueden almacenar como una disolución en tampones o en ácidos. Se almacena normalmente seco acrilato de PEG. Así, alternativamente, ambos PEGs se almacenan secos y se disuelven en tampón básico antes de usar (como se ha documentado en el ejemplo 2), o el PEG-tíol se almacena en tampón ácido y se mezcla con el acrilato de PEG antes de usar, seguido por mezcla con una base (ver el ejemplo 3). Ambas composiciones pueden incluir el sitio de unión celular y adicionalmente la sustancia del esmalte activa que comprende al menos un fragmento de amelogenina. Así, la primera composición del sistema puede incluir por ejemplo la disolución del componente nucleofílico y la segunda composición del sistema puede incluir la disolución del componente multi-aceptador. Una de las dos o ambas composiciones pueden
35 incluir la base. En otra realización, el multi-aceptador y el multitíol se pueden incluir como disolución en la primera composición y la segunda composición puede incluir la base. La conexión y mezcla tiene lugar de la misma manera que se ha descrito anteriormente para el fibrinógeno. El cuerpo de jeringa bipartito es también adecuado para los componentes precursores sintéticos. En vez de fibrinógeno y trombina los componentes multi-aceptador y multitíol se almacenan en forma pulverizada en una de las cámaras y la otra cámara contiene el tampón básico. Otras opciones también preferidas son añadir las 2 disoluciones a un recipiente, mezclarlas en él, transferirlas a, por ejemplo, una jeringa y aplicar después. De modo óptimo ambos PEGs se pueden disolver en un tampón ligeramente ácido en la jeringa 1, después unirse a una jeringa con una base que contiene luer hembra (y alternativamente modificador de viscosidad) y mezclarse mediante mezcla de jeringa-hermida.
40

45 **Definiciones**

“Biomaterial” como se usa generalmente en el presente documento se refiere a un material destinado a interconectar con sistemas biológicos para evaluar, tratar, aumentar, o reemplazar cualquier tejido, órgano o función del cuerpo dependiendo del material, temporal o permanentemente. Los términos “biomaterial” y “matriz” se usan como
50 sinónimos en el presente documento y significan una red polimérica reticulada o entrecruzada que, dependiendo de la naturaleza de la matriz, se puede hinchar con agua, pero no disolverse en agua, es decir, forma un hidrogel que permanece en el cuerpo durante un cierto periodo de tiempo realizando ciertas funciones de soporte para el tejido blando y/o duro traumatizado o defectuoso.

55 La expresión “matriz proteica” significa una matriz formada por reticulación de moléculas precursoras proteicas a una red polimérica, iónicamente, covalentemente, o por combinaciones de ambos modos, o hinchando uno o más material(es) polimérico(s), es decir, matrices, para formar una red polimérica.

60 “Matriz polisacáridica” se usa para describir una matriz formada por reticulación de moléculas precursoras polisacáridicas a una red polimérica, iónicamente, covalentemente, o por combinaciones de ambos modos, o hinchando uno o más material(es) polimérico(s), es decir, matrices, para formar una red polimérica.

65 Por “matriz sintética” se entiende una matriz que se forma reticulando moléculas precursoras sintéticas a una red polimérica, iónicamente, covalentemente, o por combinaciones de ambos modos, o hinchando uno o más material(es) polimérico(s), es decir, matrices, para formar una red polimérica.

La expresión “matriz polimérica” se usa para incluir cualquiera de las matrices proteicas, polisacáridicas y sintéticas descritas anteriormente. Un polímero es *per se* una gran molécula formada por la unión de al menos 5 monómeros.

5 Cuando se usa en el presente documento, “matriz del esmalte” significa el precursor del esmalte que se puede obtener a partir de cualquier fuente natural relevante, es decir, un mamífero en el que los dientes están en desarrollo. Una fuente adecuada es desarrollar dientes a partir de animales sacrificados tales como, por ejemplo, terneros, cerdos o corderos. Otra fuente es, por ejemplo, la piel de pescado. En el presente contexto, la expresión “una sustancia del esmalte activa” se usa para abarcar derivados de la matriz del esmalte y/o proteínas de la matriz del esmalte no discriminantes de su fuente. Las expresiones “matriz del esmalte”, “derivado de la matriz del esmalte”
10 (EMD), “proteína de la matriz del esmalte” etc. no se han de confundir con las matrices poliméricas descritas anteriormente.

15 “Nucleófilo fuerte” cuando se usa generalmente en el presente documento se refiere a una molécula que es capaz de donar un par electrónico a un grupo electrófilo en una reacción de formación de enlace polar. Preferiblemente el nucleófilo fuerte es más nucleofílico que el agua a pH fisiológico. Ejemplos de nucleófilos fuertes son los tioles y las aminas.

20 “Enlace insaturado conjugado” cuando se usa generalmente en el presente documento se refiere a la alternancia de enlaces múltiples carbono-carbono, carbono-heteroátomo o heteroátomo-heteroátomo con enlaces sencillos, o la unión de un grupo funcional a una macromolécula, tal como un polímero sintético o una proteína. Tales enlaces pueden sufrir reacciones de adición.

25 “Grupo insaturado conjugado” cuando se usa generalmente en el presente documento se refiere a una molécula o una región de una molécula que contiene una alternancia de enlaces múltiples carbono-carbono, carbono-heteroátomo o heteroátomo-heteroátomo con enlaces sencillos, que tiene un enlace múltiple que puede sufrir reacciones de adición. Los ejemplos de grupos insaturados conjugados incluyen, pero no están limitado a, vinilsulfonas, acrilatos, acrilamidas, quinonas, y vinilpiridinos, por ejemplo, 2- ó 4-vinilpiridinio e itaconatos.

30 “Moléculas precursoras sintéticas” cuando se usa generalmente en el presente documento se refiere a moléculas que no existen en la naturaleza.

“Componentes o polímeros precursores que se encuentran naturalmente” cuando se usa generalmente en el presente documento se refiere a moléculas que pudieron encontrarse en la naturaleza.

35 “Funcionalizar” cuando se usa generalmente en el presente documento se refiere a modificar una molécula de una manera que da por resultado la unión de un resto o grupo funcional. Por ejemplo, se puede funcionalizar una molécula por la introducción de una molécula que hace a la molécula un nucleófilo fuerte o una instauración conjugada. Preferiblemente una molécula, por ejemplo PEG, se funcionaliza para convertirse en un tiol, amina, acrilato, o quinona. Las proteínas, en particular, también se pueden funcionalizar eficazmente por reducción parcial o
40 completa de enlaces disulfuro para crear tioles libres.

“Funcionalidad” cuando se usa generalmente en el presente documento se refiere al número de sitios reactivos en una molécula.

45 “Funcionalidad de los puntos de ramificación” cuando se usa generalmente en el presente documento se refiere al número de brazos que se extienden desde un punto de la molécula.

50 “Sitio de adhesión o sitio de unión celular” cuando se usa generalmente en el presente documento se refiere a una secuencia peptídica a la que se une una molécula, por ejemplo un receptor favorecedor de adhesión en la superficie de una célula. Los ejemplos de sitios de adhesión incluyen, pero no están limitados a, la secuencia RGD de fibronectina, y la secuencia YIGSR de laminina. Preferiblemente los sitios de adhesión celular se incorporan al biomaterial incluyendo un dominio sustrato reticulable a una matriz.

55 “Actividad biológica” cuando se usa generalmente en el presente documento se refiere a eventos funcionales mediados por una proteína de interés. En algunas realizaciones, esto incluye eventos probados midiendo las interacciones de un polipéptido con otro polipéptido. También incluye probar el efecto que la proteína de interés tiene sobre crecimiento celular, diferenciación, muerte, migración, adhesión, interacciones con otras proteínas, actividad enzimática, fosforilación o desfosforilación proteica, transcripción, o traducción.

60 “Regenerar” cuando se usa generalmente en el presente documento significa volver a crecer una parte o totalidad de algo, tal como tejido duro o blando, en particular tejido óseo o dental.

65 “Multifuncional” cuando se usa generalmente en el presente documento se refiere a más de un grupo funcional electrofílico y/o nucleofílico por molécula (es decir, monómero, oligo- y polímero).

“Reacción autoselectiva” cuando se usa generalmente en el presente documento significa que el primer componente precursor de una composición reacciona mucho más rápido con el segundo componente precursor de la composición, y viceversa que con otros compuestos presentes en una mezcla o en el sitio de la reacción. Cuando se usa en el presente documento, el nucleófilo se une preferiblemente a un electrófilo y un electrófilo se une preferiblemente a un nucleófilo fuerte, más que a otros compuestos biológicos.

“Reticulación” cuando se usa generalmente en el presente documento significa la formación de uniones covalentes. Sin embargo, se puede referir también a la formación de uniones no covalentes, tales como enlaces iónicos, o combinaciones de uniones covalentes y no covalentes.

Un “gel” es un material en el que una red de polímero reticulado se hincha en medida finita por una fase continua de una disolución acuosa.

“Red polimérica” cuando se usa generalmente en el presente documento significa el producto de un procedimiento en el que básicamente todos los monómeros, oligo- o polímeros se unen por enlaces covalentes intermoleculares a través de sus grupos funcionales disponibles para dar por resultado una molécula muy grande.

“Fisiológicas” cuando se usa generalmente en el presente documento significa condiciones como se pueden encontrar en vertebrados vivos. En particular, condiciones fisiológicas se refieren a las condiciones en el cuerpo humano tales como temperatura, pH, etc. Temperaturas fisiológicas significan en particular un intervalo de temperatura entre 35°C a 42°C, preferiblemente alrededor de 37°C.

“Densidad de ligaduras transversales” cuando se usa generalmente en el presente documento se refiere al peso molecular medio entre dos ligaduras transversales (M_c) de las moléculas respectivas.

“Peso equivalente” cuando se usa generalmente en el presente documento se refiere a mmoles de grupo funcional/g de sustancia.

“Hinchamiento” cuando se usa generalmente en el presente documento se refiere al aumento en volumen y masa por absorción de agua por el biomaterial. Los términos “absorción de agua” e “hinchamiento” se usan como sinónimos en toda esta solicitud.

“Estado de equilibrio” cuando se usa generalmente en el presente documento es como el estado en el que un hidrogel no sufre aumento o pérdida de masa cuando se almacena bajo condiciones constantes en agua o tampón.

En el presente contexto, la expresión “oclusiva de células” se usa para describir las características de una matriz que es capaz de encerrar o bloquear células de un compartimento formado por dicha matriz, de manera que las células esencialmente no pueden cruzar hacia adentro o hacia fuera de dicho compartimento. Por ejemplo, esta función similar a la de barrera puede ser facilitada por una matriz polimérica que virtualmente está configurada como una membrana y que tiene un tamaño de poro que es más pequeño que las células que se destina a bloquear la salida o entrada a dicho compartimento. Comprensiblemente las dimensiones exactas de los poros son dependientes del tamaño de las células que van a ser bloqueadas.

LEYENDAS DE LAS FIGURAS

Figura 1

Recuperación de hueso marginal y cemento en función de la concentración de EMD en el gel.

Figura 2

Curación de defectos óseos de tamaño crítico en el cráneo de rata como una función de la concentración de EMD en el gel insertado (n = 4-5).

Figura 3

Profundidad de bolsa medida desde la CEJ al extremo apical del defecto en milímetros. * P < 0,05 (prueba de ANOVA de una vía con ajuste de Bonferroni)

Figura 4

La densidad ósea dentro del tubo y a lo largo de las paredes del tubo se valoró cuantitativamente aplicando técnicas histomorfométricas estándar.

Figura 5

La densidad ósea dentro del tubo y a lo largo de las paredes del tubo se valoró cuantitativamente aplicando técnicas histomorfométricas estándar. *** P < 0,001 (prueba de ANOVA de una vía con ajuste de Bonferroni)

Figura 6

Modelo de dehiscencia periodontal en mini-cerdos, sistema de montaje quirúrgico.

Figura 7

Documentación histológica de la regeneración de un hueso maduro y laminar separado del nuevo cemento por un ligamento periodontal bien organizado. **7A** Emdogain, **7B** PEG/Ec

Figura 8

Documentación histológica de la regeneración de un hueso maduro y laminar con PEG/Ec.

Figura 9

Observación histológica de la presencia de ligamento periodontal después de tratamiento con PEG-Ec (CMC).

Figura 10

Observación histológica de la presencia de ligamento periodontal después de tratamiento con PEG-Ec (CMC).

Figura 11

Microrrayos X para medida cuantitativa de recuperación ósea. Emdogain® alcanzó el mayor rendimiento (4 mm aproximadamente) con un significado estadístico en comparación con PEG-Ec o PEG-Ek ($p < 0,005$).

Figura 12

Documentación histológica de las morfologías de las estructuras óseas regeneradas, que eran diferentes entre los dos tipos del PEG-Ec o PEG-Ek y Emdogain®

Figura 13

Sistema de montaje quirúrgico para tratamiento de bifurcación de clase 3 en perros. En el dibujo, cada flecha corresponde aproximadamente a 5 mm.

SECCION EXPERIMENTAL

Ejemplo 1

Regeneración de Tejido de Soporte Dental en Mono

El objetivo del presente estudio fue valorar el efecto de diferentes concentraciones de derivado de la matriz del esmalte mezclado con el vehículo alginato de propilenglicol, sobre la regeneración de tejidos de soporte dental así como valorar su seguridad biológica. El derivado de la matriz del esmalte usado aquí está constituido por la fracción proteica de bajo peso molecular de una preparación de la matriz del esmalte convencional.

Materiales y Métodos

Sustancia de prueba: Derivado de la matriz del esmalte, lote PEU 801.

Fuente; La matriz del esmalte se aisló de gérmenes dentales de porcino, homogeneizados y se extrajo la fracción proteica de bajo peso molecular.

Vehículo; Disolución de alginato de propilenglicol al 2,5% peso/volumen, lote PGA 803.

Almacenamiento de la sustancia de prueba y vehículo; La sustancia de prueba y el vehículo se almacenaron a -18°C . Los frascos que contenían la sustancia y el vehículo se dejaron equilibrar con la temperatura ambiente antes de usar.

Administración de la preparación de la prueba. La sustancia se disolvió con el vehículo asépticamente bajo una campana de flujo de aire laminar usada individualmente para los monos. Las concentraciones finales de la sustancia se prueba se determinaron antes del experimento y se expresaron como mg de proteína/ml de disolución reconstituida (**tabla 4**).

Animales: Siete (7) monos (*Macaca fascicularis*), de 3 a 4 años de edad, se compraron del Primate Research Center, National Bacteriological Laboratory, Solna, SWEDEN, donde los animales se albergaron durante el experimento. A cada animal se le dio un código de identificación individual. Se mantuvieron individualmente en jaulas en un ambiente controlado:

Temperatura $18-22^{\circ}\text{C}$

Humedad relativa 40-47%

Luz entre 6 am y 6 pm

Se les dio libre acceso a una comida estándar para monos (R3, Ewos AB, Sodertälje, Sweden) y agua del grifo. La dieta se suplementó diariamente con fruta fresca.

Diseños experimentales: Los dientes de cada mono se asignaron a grupos de prueba o control. Se realizó cirugía periodontal de acuerdo con la técnica de Widman modificada. Las preparaciones de prueba se aplicaron a las superficies radiculares de los dientes de prueba antes de la reposición y sutura de los colgajos. Los dientes control

se manejaron por simulación, pero no recibieron preparación alguna de prueba. El procedimiento, de un modo por etapas, fue como sigue:

1. Treinta minutos antes de la cirugía se prepararon los viales que contenían la sustancia de prueba. Un vial de sustancia se prueba se usó para cada grupos de dos dientes. Se permitieron veinte minutos para que la sustancia de prueba se disolviera. La disolución se retiró con una jeringa de 3 ml y se dejó depositarse en el émbolo. El aire se separó cuidadosamente de la jeringa empujando el émbolo.
2. Se anestesiaron los animales con pentobarbital sódico, y el área seleccionada para cirugía se anestesió localmente y se desinfectó. Un colgajo de espesor total (colgajo mucoperióstico) se levantó en los lados orales y faciales de los dientes.
3. La placa ósea bucal se separó con una gran fresa redonda bajo enjuague constante con disolución salina estéril. El área se enjuagó rigurosamente con disolución salina estéril y las raíces dentales expuestas se grabaron durante 30 segundos con ácido ortofosfórico o cítrico al 37% (pH 1). Se dio un enjuague final con disolución salina estéril. El exceso de fluido se limpió con algodón.
4. Las preparaciones de prueba se aplicaron inmediatamente comenzando en la parte más apical de los defectos óseos y se cubrieron las superficies íntegras de las raíces expuestas.
5. Los colgajos se reposicionaron y suturaron conjuntamente. No se usó apósito periodontal.
6. Se registró diariamente el aspecto clínico local en torno a los dientes controles y experimentales y conducta general de los monos.

Estudios terminales. Después de cincuenta y seis días (8 semanas), los monos se sacrificaron por una sobredosis de pentobarbital sódico y los dientes controles y restantes se evaluaron histológicamente.

Preparación histológica. Los dientes experimentales y controles junto con el hueso alveolar circundante y tejido blando se diseccionaron y usaron para examen por microscopía óptica. Las muestras se fijaron en formalina tamponada fría al 10% durante 48 horas, se desmineralizaron en ácido fórmico al 5%, se incrustaron en parafina y se seccionaron paralelamente a lo largo del eje de los dientes en una dirección bucolingual. Las secciones se cortaron en serie de pasos en niveles distanciados 20 μm y se tiñeron con hematoxilina y eosina. Se examinaron después por transmisión con luz ordinaria y polarizada.

Evaluación. Se registraron las reacciones de los tejidos en las superficies radiculares expuestas y se midió la distancia, expresada en porcentaje de superficie radicular expuesta, que había sido cubierta por el nuevo hueso alveolar y el nuevo cemento (ver figura 1).

Métodos estadísticos. Se usaron métodos estadísticos no paramétricos, es decir, la prueba de suma de rangos de Wilcoxon y la prueba U de Mann-Whitney, para valorar el significado de las diferencias entre sitios controles y de pruebas. Los niveles de significación se indican como sigue:

1. NS no significativo
2. * $p < 0,05$
3. ** $p < 0,01$
4. *** $p < 0,001$

Almacenamiento de datos y muestras. Todos los datos en bruto, muestras, el protocolo e informe final de este estudio están almacenados en los archivos de BIORA AB, Krokusvägen 12, 181 31 Lidingö, SWEDEN. Referencias relevantes: BIORA Scientific report 9/88.

Resultados

Observaciones críticas. Todos los animales permanecieron sanos a lo largo del periodo de prueba y no se observaron efectos secundarios adversos. La curación tanto en dientes de prueba como en dientes controles fue sin incidentes.

Conducta general. Todos los animales se comportaron con normalidad con ningunas diferencias aparentes entre animales individuales.

Consumo de alimentos. El consumo de alimentos y agua pareció ser normal con ningunas diferencias evidentes entre animales individuales.

Estudios terminales

Examen macroscópico. El aspecto macroscópico reveló encía sana alrededor de todos los dientes de prueba sin inflamación gingival evidente. No se observaron efectos secundarios adversos. La encía bucal de todos los dientes controles muestra una inflamación moderada con un margen gingival reclinado.

Examen microscópico. El examen microscópico y morfométrico reveló diferencias significativas entre los grupos de dientes de prueba y controles (**tabla 4 y 5**). Cemento nuevo firmemente unido a la superficie radicular instrumentada se había formado en grados variables en los dientes de prueba. La capa de cemento contenía fibras periodontales funcionalmente orientadas asociadas con una membrana periodontal tal como se revela por microscopía con luz polarizada. Además, hueso alveolar unido a la membrana periodontal estaba presente en grados variables sobre las superficies radiculares experimentales expuestas (**tabla 4 y 5**). El epitelio de unión no había proliferado más allá de la recién formada capa de cemento y la inflamación gingival era prácticamente inexistente. Ni nuevo hueso alveolar ni nuevo cemento significativo se había formado en los dientes controles. Las superficies radiculares expuestas originalmente estaban cubiertas por un largo epitelio de unión que se había retraído hasta aproximadamente la mitad del camino hacia la raíz. Una moderada inflamación gingival estuvo presente en la mucosa oral bucal. Se encontraron que eran significativas a varios niveles las diferencias de análisis estadístico entre los grupos de dientes de prueba y controles (**tablas 4 y 5**).

15 **Discusión**

El objetivo del presente estudio fue valorar el efecto de diferentes concentraciones de derivado de la matriz del esmalte, mezclado con el vehículo alginato de propilenglicol, sobre la regeneración de tejidos de soporte dental, así como valorar su seguridad biológica. El modelo usado en el presente estudio es casi idéntico al de entornos clínicos destinados al uso clínico de derivado de la matriz del esmalte. La preparación de la prueba se administró como una ayuda quirúrgica durante la cirugía periodontal convencional. Sobre una base de peso corporal las dosis administradas son inferiores y superiores a la dosis destinada para usar en humanos, que es 7,5 mg de proteína en una sola aplicación de tamaño equivalente. Se usaron como controles operaciones simuladas.

Los tejidos de soporte dental (cemento, membrana periodontal y hueso alveolar) no se regenerarán normalmente tras el tratamiento de periodontitis marginal. En cambio, la superficie radicular expuesta será cubierta por una capa de células epiteliales que no proporcionan una unión funcional para el diente. Así, los tejidos de soporte dental perdidos en la enfermedad periodontal no se pueden regenerar con métodos convencionales. Esto se confirmó por los resultados registrados para los dientes controles. Sin embargo, las superficies radiculares condicionadas con las preparaciones de prueba de 5,3, 10,7 y 26,7 mg de proteína/ml habían desarrollado un aparato de unión periodontal aparentemente nuevo. Estudios recientes sobre la formación de la superficie de la raíz dental han demostrado que está no solamente cubierta con cemento, sino también con una capa delgada de un tejido similar al esmalte. Este tejido similar al esmalte se forma durante el desarrollo de la raíz antes de la formación de cemento. Parece que proporciona una superficie adecuada sobre la que las células que forman el cemento pueden crecer. En consecuencia, el cemento se deposita sobre el tejido similar al esmalte y un adecuado aparato de unión se desarrollará.

El presente estudio ha demostrado que, acondicionando superficies radiculares raspadas (instrumentadas) con dosis de derivado de la matriz del esmalte que exceden de 10 mg, se formará cemento adherente normal y membrana periodontal asociada (periodonto funcional). Además, se había formado hueso alveolar asociado con la membrana periodontal. Estas estructuras no se forman normalmente tras la cirugía periodontal convencional. En cambio, el epitelio de la encía cubrirá la superficie radicular expuesta y el nivel de hueso marginal en el mejor de los casos seguirá siendo el mismo. Esto pone de relieve la necesidad de una nueva definición de regeneración periodontal exitosa, basada en los hallazgos del presente estudio.

La regeneración periodontal exitosa debe implicar la formación de nuevo cemento firmemente unido a la superficie radicular instrumentada. La capa de cemento debe contener fibras periodontales orientadas funcionalmente, asociadas con una membrana periodontal. Además, debe estar presente hueso alveolar recién formado unido a la membrana periodontal.

También fue evidente que la recuperación de nueva unión y hueso alveolar asociado ocurre solamente a nivel de superficie radicular cubierta por tejido blando oral reposicionado. Cuanto más arriba en una dirección coronal está cubierta la superficie radicular, mayor ganancia de hueso marginal es posible. Además, se puede concluir a partir de los resultados que una concentración de derivado de la matriz del esmalte disuelto en PGA que es inferior a 5 mg de proteína/ml no es suficiente para inducir regeneración periodontal exitosa. Sin embargo, por encima de esta concentración, una suficiente cobertura de las superficies radiculares pareció ser posible.

Tabla 4

Esquema experimental y recuperación de cemento y hueso alveolar. Expresada en porcentaje (%) del nivel original

5

Mono	Diente	Tratamiento y concentración de proteína (mg/ml)	Recuperación de hueso marginal (%)	Recuperación de cemento (%)
11/87	14	Control	0	0
11/87	15	Control	0	1
11/87	24	Control	0	0
11/87	25	Control	0	2
12/87	14	Control	0	2
12/87	15	Control	0	0
12/87	24	Control	0	1
12/87	25	Control	0	3
16/88	14	PEU 0,53	5	8
16/88	15	PEU 0,53	12	16
16/88	24	PEU 5,3	71	76
16/88	25	PEU 5,3	65	69
17/88	14	PEU 2,7	27	30
17/88	15	PEU 2,7	13	19
17/88	24	PEU 26,7	78	86
17/88	25	PEU 26,7	83	85
18/88	14	PEU 10,7	68	75
18/88	15	PEU 10,7	84	87
18/88	24	PEU 0,53	7	8
18/88	25	PEU 0,53	3	4
19/88	14	PEU 2,7	17	19
19/88	15	PEU 2,7	6	9
19/88	24	PEU 5,3	69	74
19/88	25	PEU 5,3	73	77
20/88	14	PEU 26,7	87	91
20/88	15	PEU 26,7	92	94
20/88	24	PEU 10,7	64	67
20/88	25	PEU 10,7	64	87

10 **Tabla 5**

Comparación estadística entre grupos controles y experimentales

Grupos de prueba

Número de sitios de prueba: Veinte (20)

15

Tabla 5A

Recuperación media de hueso marginal:

PEU 0,53	PEU 2,7	PEU 5,3	PEU 10,7	PEU 26,7
6,8%	15,8%	69,5%	75,0%	85,0%

20

Tabla 5B

Recuperación media de cemento:

PEU 0,53	PEU 2,7	PEU 5,3	PEU 10,7	PEU 26,7
9,0%	19,3%	74,0%	79,0%	89,0%

25

Grupo control

Número de sitios control: Ocho (8)

Ganancia media de hueso marginal: 0,0%

30

Ganancia media de cemento: 1,1%

Prueba de significación estadística

Su usó un método estadístico no paramétrico, la prueba U de Mann-Whitney, para valorar la significación de diferencias entre sitios de prueba y controles. Se descubrió que los niveles de significación cuando se comparan grupos de prueba y controles para la recuperación de cemento y hueso marginal son:

Tabla 5C

Significación estadística

	PEU 0,53	PEU 2,7	PEO 5,3	PEU 10,7	PEU 26,7	Control
PEU 0,53	NS	NS	**	***	***	NS
PEU 27	NS	NS	*	**	*	NS
PEU 53	**	*	NS	NS	*	**
PEI 10,7	***	**	NS	NS	NS	***
PEU 26,7	***	*	*	NS	NS	***
Control	NS	NS	**	***	***	NS

Ejemplo 2

Defecto Craneal de Tamaño Crítico de Rata

Cirugía Craneal de Rata

Este protocolo de experimento animal se ha evaluado y permitido por la Autoridad Veterinaria del Cantón de Zurich de acuerdo con la ley Federal Suiza (No. 152/1997). Se usan ratas albinas Sprague-Dawley (de 84-92 días de edad, todas hembras). Se albergan en grupos de cuatro animales o menos y mantenidas en una dieta estándar.

Se anestesian 27 animales por inducción y mantenimiento con halotano/O₂. Se recorta el área quirúrgica y se prepara con Betadine para cirugía aséptica. Se hace una escisión lineal desde el hueso nasal hasta la cresta mediosagital. El tejido blando se repliega y el periostio se disecciona desde el sitio (huesos occipital, frontal, y parietal). Se crea un defecto de 8 mm por craneotomía con un trépano en una pieza de mano dental, evitando cuidadosamente la perforación de la duramadre. El área quirúrgica se lava después abundantemente con disolución salina para separar restos óseos y se coloca un gel preformado dentro del defecto. Los tejidos blandos se cierran después con grapas de piel. Tras la operación se proporciona analgesia por inyección subcutánea de buprenorfina (0,1 mg/kg). Las ratas se sacrifican posteriormente mediante asfixia con CO₂ en el momento apropiado tras la implantación. Los sitios de craneotomía con 5 mm de hueso contiguo se recuperan del cráneo y se colocan en etanol al 40%, o se colocan en medio de fijación (paraformaldehído al 4%).

En todos las etapas, el cirujano es ciego respecto al tratamiento de los defectos.

Preparación de geles

Se disolvió EMD en ácido acético al 0,10% para producir disoluciones madre con diversas concentraciones, dependiendo del contenido deseado de EMD de los geles finales. Se disolvió cisteína-RGD, PEG-ditiol 3,4k, y acrilato de PEG 15k de 4-brazos en tampón de trietanolamina/HCl 0,30 M, pH 8,5. Se moldearon geles de PEG-EMD mezclando todas las disoluciones para producir 20 µl de disolución que contenía aproximadamente 15% en peso de PEG con números equimolares de grupos acrilato y tiol, 8 µg de cisteína RGD y 0-250 µg de EMD. La disolución se dejó gelificar durante 1 hora a 37°C y los geles se transfirieron después a PBS, pH 7,4. Después de varias horas se habían hinchado a un volumen de 100 µl, y un diámetro de 8 mm.

Radiografía

Se obtienen imágenes de las muestras obtenidas tras el sacrificio y separación del sitio de defecto con el hueso contiguo circundante de 5 mm, usando una unidad de radiografía dental con películas dentales de velocidad ultra (Eastman Kodak Company, NY, USA). Después se escanean las radiografías y las imágenes digitales se procesan con un programa de análisis de imágenes (Leica® Q-Win). El área de nuevo hueso formado dentro y fuera de los defectos se calcula como porcentaje de área del defecto original para comparar la velocidad de curación de las diferentes formulaciones (ver figura 2).

Ejemplo 3

Regeneración de Tejido de Soporte Dental en cerdo

Objetivo:

Usar un modelo de dehiscencia para comparaciones clínicas, cuantitativas e histológicas de los efectos locales de tratamiento con derivados de la matriz del esmalte y/o materiales de injerto, geles de PEG y sobre la curación y procesos regenerativos en la mandíbula en comparación con dientes controles simulados.

Animales:

Minicerdos, Sus scrofa, adultos (> 18 meses), hembras. Los animales son aclimatados y observados en las instalaciones animales locales antes de la cirugía.

Descripción experimental:

1. El animal se mantiene bajo anestesia (i.m. Ketalar + Pentotal y Dormicum). Anestesia local con xilocaína – adrenalina (Dental).
2. El animal es inspeccionado.
3. En caso necesario, el cerdo es afeitado alrededor de la boca y la piel se lava después con chlorhexidin® (5 mg/ml en EtOH al 60%). El área de operación se fotografía.
4. Comienzo en Q1: se aplica anestesia por infiltración en el pliegue mucobucal. Se deben evitar inyecciones en la papila interdental y área gingival marginal.
5. Se evalúa el grado de inflamación y se separa la placa y el cálculo.
6. Se hace una incisión marginal desde el primer premolar al primer molar con incisiones perpendiculares liberadoras en los extremos. El colgajo mucoperiostico se levanta para exponer el hueso alveolar.
7. El hueso bucal se separa cuidadosamente, usando una fresa e instrumentos manuales, de cada raíz dental creando defectos de dehiscencia de aproximadamente 6 mm de profundidad y 2 mm de anchura. El ligamento periodontal y el cemento se separan de la superficie radicular expuesta, bajo irrigación constante con disolución salina estéril, desde el segundo premolar hasta el cuarto premolar a una distancia de 6 mm desde la CEJ. El extremo apical del defecto (AED) se marca con una hendidura. Se ha de crear un total de 6 defectos en cada cuadrante (es decir, 12 en cada mandíbula/animal).
8. Tras la separación del ligamento y cemento, las superficies dentales se tratan con PrefGel® (BIORA, Sweden) durante 2 minutos antes de ser lavadas con abundantes cantidades de disolución salina estéril.
9. Se mide la distancia desde la CEJ al AED y se indica y documenta por fotografía.
10. El material de prueba (Ver lista de tratamientos, simulacro = ninguno) se aplica en los defectos y se documenta por fotografía.
11. El colgajo se reposiciona inmediatamente y se cierra con suturas de vicrilo. El colgajo cubre completamente los defectos óseos y el colgajo se reposiciona y fija rigurosamente, lo que nuevamente se documenta por fotografía.
12. De acuerdo con los puntos 4-14, el procedimiento se repite para Q2.

Post-tratamiento:

Los animales se ponen en dieta blanda durante 1 semana tras la cirugía. Antibiótico (se administra estreptocilina, 5 mill u/día, durante 2 días desde la cirugía). Analgésicos (Voltaren, 25 mg tras la cirugía).

Observación:

A las 4, 6 y 8 semanas los animales son sedados y la curación de los defectos experimentales se examinan. Se exploran las profundidades de los defectos usando una sonda de bolsa estándar (clínica humana) y la “profundidad de sondaje de bolsa” se registra en milímetros para cada defecto junto con el grado (si lo hubiere) de recesión gingival. La curación se documenta por fotografía. Todos los sucesos adversos se indican.

Terminación:

El experimento se termina y los animales se sacrifican tras 8 semanas de observación:

1. 40 ml de pentobarbital sodio 100 mg/ml en Spiritus fort. 290 g/1000 ml se da i.c. a los animales 8 semanas después de la cirugía de acuerdo con el esquema de prueba.
2. Un segmento que incluye todos los dientes experimentales con raíces completas se corta de cada mandíbula experimental.
3. Los segmentos separados se sumergen inmediatamente en un gran volumen (200 ml) recién preparado, refrigerado (4°C), de formalina tamponada con fosfato a pH 7,4. Los recipientes se deben etiquetar cuidadosamente con número de animal, número de cuadrante, cirujano y fecha. La formalina se cambia una vez después de 4 horas para asegurar buena fijación.
4. Las muestras se tratan para incrustación en epoxi y seccionar por pulimento lo más pronto posible. Hasta que el tratamiento es posible las muestras fijadas por formalina se almacenan en frigorífico.

Preparación de estuches

Todos los materiales se manipulan bajo condiciones asépticas.

Disolución de PEG-tiol/EMD:

Se disolvieron 1,20 g de PEG-tiol 2k de 4-brazos en 20 ml de disolución estéril de ácido acético acuoso al 0,05%. Esta disolución se esterilizó por filtración. Se disolvieron 0,520 g de EMD estéril en 10 ml de disolución estéril de ácido acético acuoso al 0,05%. Ambas disoluciones se combinaron y se rellenaron jeringas de vidrio estériles con 300 µl de cada disolución de PEG-tiol/EMD. (12 mg de PEG-tiol 2k de 4-brazos y 5,2 mg de EMD por jeringa).

Disoluciones activadoras:

5 Se disolvieron 1,865 g de trietanolamina (Merck, Perú) en 250 ml de WFI (agua para inyección) (0,050 M) y el pH de la disolución se ajustó a pH 8,6 usando HCl. Se disolvieron 5,0 g de Keltone HVCR (ISP) en 95 ml de trietanolamina/disolución de HCl bajo vigorosa agitación. Con la disolución resultante se llenaron jeringas de plástico con luer hembra (678 mg). Se disolvieron 3,0 de Cekol 10'000 (Noviant; S1408) en 80 ml de trietanolamina/disolución de HCl bajo agitación vigorosa. Con la disolución resultante se llenaron jeringas de plástico con luer hembra (678 mg). Las jeringas activadoras se colocaron individualmente en bolsas de piel y vapor esterilizado (121°C/15 min).

Viales de acrilato de PEG:

10 3,6 g de acrilato de PEG 15k de 4-brazos (Nektar) se disolvieron en 35 ml de WFI (agua para inyección). En un ambiente limpio, con alícuotas de 0,70 ml de estos viales de disolución se llenaron viales y se liofilizaron. Tras liofilizar, los viales se llenaron con nitrógeno y se cerraron. (72 mg de acrilato de PEG 15k de 4-brazos por vial)

Preparación de los geles de PEG/EMD (4,9 mg de EMD por g de gel):

15 Justo antes de la aplicación, el acrilato de PEG liofilizado se reconstituyó en la disolución de PEG-tiol/EMD y la disolución resultante se transfirió de nuevo a la jeringa de vidrio, que se acopló luego a una jeringa activadora. Los contenidos de ambas jeringas se mezclaron moviendo los émbolos una y otra vez aproximadamente 15 minutos. Después de mezclar, el producto se pudo aplicar durante aproximadamente 2 min, antes de que se había gelificado completamente.

Tabla 6

Sistema experimental de cirugía de minicerdo

25	No. EXP	ID CERDO	TRATAMIENTO planificado	TRATAMIENTO realizado
	1	62307	Q1: Simulación quirúrgica Q2: Simulación quirúrgica	Q1: Simulación Q2: Simulación
30	2	65867	Q1: 30 mg/ml de Emdogain Q2: 30 mg/ml de Emdogain	Q1: 30 mg/ml de Emdogain Q2: 30 mg/ml de Emdogain
	3	64447	Q1: 30 mg/ml de Emdogain Q2: 30 mg/ml de Emdogain	Q1: 30 mg/ml de Emdogain Q1: 30 mg/ml de Emdogain
35	13	66770	Q1: 5 mg/ml de EMD + 2ª gener. EMD. ALG Q2: 5 mg/ml de EMD + 2ª gener. EMD. ALG	Q1: Tampón-Keltone, GLP 41/46 + 5 mg/ml de Emdogain, GLP 41/47 Q2: Tampón-Keltone, GLP 41/46 + 5 mg/ml de Emdogain, GLP 41/47
40	14	82118	Q1: 5 mg/ml de EMD + 2ª gener. EMD. CMC Q2: 5 mg/ml de EMD + 2ª gener. EMD. CMC	Q1: Tampón-Cekol, GLP 41/45 + 5 mg/ml de Emdogain GLP 41/47 Q2: Tampón-Cekol, GLP 41/45 + 5 mg/ml de Emdogain, GLP 41/47

45 Todos los defectos se trataron con PrefGel® en 1 minuto seguido por lavado abundante con disolución salina antes de la aplicación del artículo de prueba.

Lista de artículos usados:

50	PerfGel	Lote 1008
	Emdogain, 30 mg/ml	Lote ETP 3102
	PGA	Lote FoU 2113 en viales de 1,5 ml
	EMD, 9,5 mg/vial	Lote 9102
55	Hueso de cerámica	Lote LK 040109

Resultados

60 Como se puede ver claramente en la tabla 7, el derivado de sustancia del esmalte activa (EMD) a una concentración de 4,9 mg/ml en GLP 41/47 tenía un efecto similar, o incluso más pronunciado sobre la curación de los defectos experimentales que Emdogain 30 mg/ml. Los resultados se compendian en la figura 3. También, como se deduce de la figura 3, comparando vacío, Emdogain y EMD a una concentración de 4,9 mg/ml en geles de Keltone o Celco, después de 4 semanas Emdogain se comporta algo mejor que EMD a una concentración de 4,9 mg/ml en geles de Keltone o Celco, después de 6 semanas se comportan aproximadamente igual y después de 8 semanas EMD a una concentración de 4,9 mg/ml en geles de Keltone o Celco se comporta mejor. Esto se corresponde muy bien con el tiempo de degradación de 4 semanas encontrado para este tipo de gel in vitro (37°C, pH 7,4). Siempre que el gel de PEG esté presente se esperaría que dificulte el relleno del defecto con hueso en un cierto grado.

Tabla 7

5 **Profundidad de sondaje de bolsa en mm: diferencia en la media entre momentos de cirugía y observación**

No. Exper. cerdo	Q1 semana 4	Q1 semana 6	Q1 semana 8	Q2 semana 4	Q2 semana 6	Q2 semana 8
1	1,7	2,7	3,2	1,8	2,5	3,5
2	2,5	3,2	3,5	2,7	2,5	2,7
3	2,5	3,0	3,5	1,8	3,3	3,5
13	1,7	2,5	3,5	2,3	3,7	4,0
14	1,3	3,0	4,5	2,0	3,0	-

10 **Ejemplo 4**

Defecto de broca cilíndrica en cráneo de conejo

Los resultados de este experimento proporcionan información respecto al efecto de un nuevo sustituto óseo bioactivo sobre la regeneración ósea guiada.

15 **Hipótesis:**

El efecto de unir sustancias del esmalte activas a una matriz recién desarrollada con capacidades optimizadas de crecimiento interno celular aumenta la regeneración de tejido óseo en comparación con procedimientos de injerto estándar (control positivo) y con la curación espontánea (control negativo).

20 **Materiales y Métodos:**

Animales

En el presente estudio se usaron 24 conejos blancos adultos New Zealand, con peso entre 3 y 4 kg, Los animales se mantuvieron en un ambiente diseñado a propósito para animales experimentales y se alimentaron con una dieta estándar de laboratorio.

Procedimientos quirúrgicos y materiales:

Se hizo una incisión recta sobre la frente (bóveda craneal) de 24 conejos blancos New Zealand, y se levantaron dos colgajos cutáneos y se replegaron lateralmente. De modo similar se cortó el periostio y se replegó exponiendo la parte superior del hueso craneal. En el área de los huesos parietal y frontal derecho e izquierdo se preparó un surco usando un taladro trépano con un manguito que solo permite una profundidad de perforación de 1 mm. Se tuvo cuidado de asegurarse de que la placa cortical externa dentro de este círculo no se retiró. Se hicieron cinco pequeños defectos con fresa redonda en la placa superior cortical en el interior del círculo para permitir un mejor acceso a la médula ósea en la cámara. Posteriormente, un tubo cilíndrico hecho de titanio con una muesca de rosca de 1 mm de profundidad fue sentado en cada uno de los surcos para estabilidad primaria. Los 4 tubos mostraron una superficie mecanizada en su interior. Los tubos midieron 6 mm de altura y 6 mm de diámetro exterior.

La distribución de materiales dependió de cada estudio individual. Sin embargo, en cada estudio, uno de los tubos sirvió como un control negativo y se dejó vacío. Los tres materiales próximos incluyeron los materiales de prueba así como un control positivo si es apropiado. Cuando se usó el control positivo, se usó un material de injerto estándar. Una opción fue usar un mineral óseo de origen bovino usado hoy día en procedimientos estándar de injertos humanos (Bio-Oss®, Geistlich AG, Wolhusen, Swizerland). Los materiales se distribuyeron entre los cilindros en cada animal, de manera que el número de cilindros anterior y posterior para cada animal fue el mismo y el número a la izquierda y derecha fue el mismo. Finalmente, para controlar los efectos sistémicos, si se realizó una serie de dosificación, ningún par de materiales con diferentes dosis de factor activo se colocó en el mismo animal y algunas muestras de control se colocaron a propósito en animales que nunca recibieron tratamiento con sustancia del esmalte activa. Cada muestra se hizo en parejas en un animal individual, por tanto los materiales idénticos en la parte anterior y posterior eran un conjunto.

Los tubos se dejaron abiertos hacia el lado del hueso, pero se cerraron con una tapa de titanio hacia la piel cubridora-colgajo perióstico. El periostio y el colgajo cutáneo fueron adaptados y se suturaron. 8 animales fueron sacrificados 4, 8 y 16 semanas después, El número de muestras en cada momento para cada tratamiento fue ocho.

Matrices y factores de crecimiento

Básicamente se usaron dos matrices diferentes en esta prueba. Una matriz de fibrina derivada de fibrinógeno humano y un gel sintético a base de PEG, ambas modificadas específicamente para altas capacidades de crecimiento interno celular. Los geles comprendían una sustancia del esmalte activa, por lo cual la sustancia del esmalte activa interaccionaba con su matriz de liberación (enlace covalente) para conseguir un perfil de liberación

específico tras la implantación. Los geles se mezclaron alternativamente con gránulos sintéticos de fosfato cálcico. Los gránulos usados consistían en una mezcla de un fosfato tricálcico/hidroxiapatita (relación 40:60) que se utiliza mucho en cirugía humana, para conseguir un material de reconstrucción similar a la masilla para procedimientos de injerto.

5

Se preparó EMD en dos concentraciones y en dos tipos de geles:
PEG + 100 µg/ml de EMD y PEG + 500 µg/ml de EMD datos y PEG/RGD + 500 µg/ml de EMD

Preparación histológica e histomorfometría

10 Las muestras se trataron de acuerdo con procedimientos estándar para secciones pulidas sin descalcificación. La densidad ósea dentro del tubo y a lo largo de las paredes del tubo se valoró cuantitativamente aplicando técnicas histomorfométricas estándar.

Estadística

15 Se usó la prueba de ANOVA de una vía con ajuste de Bonferroni para detectar diferencias entre prueba y control, así como a lo largo del tiempo con respecto a prueba o control. El nivel de significación en todas las pruebas estadísticas se elige en $\alpha = 0,05$.

Resultados

20 Las figuras 4 y 5 demuestran claramente que PEG/RGD + 500 µg/ml de EMD tiene el mejor efecto sobre la regeneración ósea. Por tanto la unión de sustancias del esmalte activas a una matriz nuevamente desarrollada con capacidades optimizadas de crecimiento interno celular mejora la regeneración de tejido óseo.

Ejemplo 5

25

Modelo de dehiscencia periodontal en minicerdos

1. Introducción y fundamentos

30 En la presente investigación se ha probado derivado de la matriz del esmalte (EMD) preparado con dos nuevos vehículos (PEG con alginato o carboximetilcelulosa). El modelo de dehiscencia en minicerdos es de referencia histórica en lo que respecta a comparaciones clínicas, cuantitativas e histológicas de los efectos locales de tratamiento con derivados de la matriz del esmalte (EMD) sobre la curación y procesos regenerativos de tejidos periodontales.

3. Objetivos

35 El principal objetivo a seguir consiste en la evaluación de la regeneración periodontal comparativamente entre Emdogain® y derivado de la matriz del esmalte (EMD) preparado con los dos nuevos vehículos (PEG con alginato o carboximetilcelulosa).

4. Variables bajo investigación

4.1. Variable principal

45 • La variable principal consistía en la evaluación clínica de la reducción en la profundidad de sondaje de bolsa periodontal.

4.2. Variables secundarias

50 • La histología descriptiva y la histomorfometría basada en la evaluación de la reducción de la profundidad de defecto óseo, altura de cemento, presencia de ligamento periodontal, área ósea, formó el primer grupo de variables secundarias. Cuando se trata de la evaluación cuantitativa de tejidos mineralizados, las medidas óseas en microrrayos X mejoran mucho la calidad del método histomorfométrico porque solamente los tejidos mineralizados aparecen en las secciones. Esta es la razón por la que en este estudio la histomorfometría se ha realizado en microrrayos X obtenida a partir de secciones histológicas.

55 • El grado de inflamación (ninguno, leve, moderado, grave), la longitud y anchura de la recesión (medida en mm desde el punto de unión cemento-esmalte hasta la parte superior de la encía) pertenecía al segundo grupo de variables secundarias.

5. Materiales y Métodos

5.1. Animales

60 Minicerdos, Sus scrofa, adultos (> 18 meses), hembras. Los animales han sido aclimatados y observados en las instalaciones animales locales antes de la cirugía.

5.2. Cirugía y post-cirugía

65

5.2.1. Cirugía

Los animales se han mantenido bajo anestesia general (Ketalar i.m. + Dormicum i.v.). Además se realizó localmente anestesia local con xilocaína – adrenalina.

5 Las diferentes etapas del procedimiento fueron las siguientes:

- Inspección del animal y registro en la página 1 el Formulario de Registro.

10 - Los cerdos fueron afeitados alrededor de la boca y la piel se lavó después con chlorhexidin® (5 mg/ml en EtOH al 60%).

- Comienzo en Q1: Se realizó anestesia por infiltración en el pliegue mucobucal evitando inyecciones en la papila interdental y área gingival marginal. Se ha evaluado el grado de inflamación y separado la placa y el cálculo.

15 - Tras haber hecho una incisión marginal desde el primer premolar al primer molar con incisiones perpendiculares liberadoras en los extremos, el colgajo mucoperióstico se levantó para exponer el hueso alveolar de las mandíbulas superiores.

20 - Con ayuda de fresa e instrumentos manuales se han separado “ventanas” de placa de hueso bucal así como ligamento periodontal y cemento del segundo premolar al cuarto premolar bajo irrigación constante con disolución salina estéril. Los defectos verticales se han creado en el mismo eje de cada raíz dental a una distancia de 5-6 mm de la CEJ. El extremo apical del defecto (AED) se marcó con una hendidura. Las dimensiones finales medias de los defectos fueron las siguientes: altura = 6 mm, anchura = 2 mm, profundidad = 3 mm.

25 - Tras la separación del ligamento y cemento, las superficies dentales se trataron con PrefGel durante 2 minutos antes de ser lavadas con cantidades abundantes de disolución salina estéril.

- Se midió y registró la distancia desde la CEJ al AED.

30 - Los materiales de prueba (simulación = ninguno) se han aplicado en los defectos.

- Tras el reposicionamiento del colgajo, el sitio de operación se cerró con suturas de vicrilo. Se prestó una atención especial para asegurarse de que el colgajo cubría completamente los defectos óseos y que se reposicionó y fijó rigurosamente.

35 - El mismo procedimiento se repitió para el segundo cuadrante.

La figura 6 muestra una herida típica de cirugía.

5.2.2. Post-cirugía

Los animales han sido puestos en dieta blanda durante tras la cirugía. Antibiótico (se administró estreptocilina, 5 mill u/día, durante 2 días desde la cirugía); analgésicos (Voltaren, 25 mg) tras la cirugía.

5.3. Grupos de prueba y controles

45 Un total de 10 animales se incluyó en este estudio, pero uno murió por razones no relacionadas con la implantación de uno de los materiales probados. Como se prepararon dos defectos en cada diente maxilar y se usaron 6 dientes en cada animal, el número total de defectos en cada animal fue 12. En los grupos más relevantes (ver más abajo) se han evaluado un total de 48 defectos para cada tipo de tratamiento. Los grupos siguientes estuvieron bajo investigación:

5.3.1. Grupos de prueba

PEG-Ec = PEG (con CMC) + EMD (a una concentración de 4,9 mg/ml): 4 animales

PEG-Ek = PEG (con Alg) + EMD (a una concentración de 4,9 mg/ml): 3 animales

5.3.2. Grupo control positivo

Emdogain® (disponible comercialmente, con EMD a una concentración de 30 mg/ml): 1 animal

5.3.3. Grupo control negativo

60 Tabla 8

Vacío: 1 animal

	Número de animales
Simulado	1

Emdogain	1
PEG-Ek (Alg)	3
PEG-Ec (CMC)	4

5.4. Tiempo de curación

5 De acuerdo con los datos previos disponibles en Straumann-Biora (Malmö) se previó valorar la situación clínica y realizar medidas periodontales después de 4, 6 y 8 semanas. Además se ha realizado evaluación histológica (cualitativa y cuantitativa) después de un periodo de curación de 8 semanas.

5.5. Terminación

10 Una inyección de 40 ml de Pentobarbital sodio 100 mg/ml en Spiritus fort. 290 g/1000 ml se da i.c. a los animales 8 semanas después de la cirugía de acuerdo con el esquema de prueba.

Se cortó un segmento que incluye todos los dientes experimentales con raíces completas de cada mandíbula superior experimental.

15 **5.6. Métodos de análisis**

5.6.1. Sondaje periodontal

20 El sondaje periodontal realizado con una sonda se destinó a evaluar la profundidad de bolsa en el día de la operación y después de 4, 6 y 8 semanas. Estas medidas se realizaron de acuerdo con las reglas clásicas del "método ciego". El investigador no sabía a qué grupo pertenecía el animal bajo examen.

5.6.2. Histología

25 Los segmentos separados se sumergieron inmediatamente en un gran volumen (200 ml) recién preparado, refrigerado (4°C), de formalina tamponada con fosfato a pH 7,4. La formalina se cambió una vez después de 4 horas para garantizar una buena fijación.

Las muestras se trataron para incrustación en epoxi y seccionar por pulido (a un espesor de aproximadamente 25 µm).

30 Las muestras se trataron por métodos clásicos de preparación no desmineralizada seguido por incrustación en metacrilato de metilo, seccionamiento (Polycut-S, Reichert-Jung, Leica Microsystems Switzerland) y tinción con azul de toluidina.

35 Las secciones histológicas se han usado para el análisis cualitativo y semi-cuantitativo destinado a definir la presencia de un ligamento periodontal en el sitio injertado.

5.6.3. Microrradiografía

40 Usando un generador de rayos-X se realizaron microrradiografías en secciones histológicas antes de que se había intentado el pulido final (espesor 50 µm) y se analizaron cuantitativamente por microscopía óptica para evaluar la altura y área de hueso.

6. Resultados

45 **6. 1. Sondaje periodontal clínico y medidas de recesión**

En el presente documento se compendiarán solamente los resultados referentes a las medidas de profundidad de bolsa.

6.1.1. Sondaje periodontal clínico

50 Estas medidas clínicas demostraron que cada tratamiento por sí mismo es beneficioso en términos de reducción de profundidad de bolsa. Existe una disminución progresiva de la profundidad de bolsa dentro de cada grupo desde el día de la operación hasta la semana 8, a través de las semanas 6 y 4. Las diferencias son estadísticamente significativas dentro de cada grupo entre estos momentos diferentes. La única excepción es la presencia de una fase de meseta desde la semana 4 hasta la semana 8 para el grupo de Emdogain. En algunos casos las diferencias son también estadísticamente significativas cuando se comparan los respectivos momentos de un grupo con otro.

60

Tabla 8

Tratamiento	Número de defectos (n)	Profundidad de bolsa en la operación	Profundidad de bolsa tras 4 semanas	Profundidad de bolsas tras 6 semanas	Profundidades de bolsas tras 8 semanas
PEG/Ec	47	6,69	4,74	3,98	3,28
PRG/Ek	35	6,68	5,18	3,47	3,48
Emdogain	12	6,35	3,60	3,65	2,45
Cirugía de simulación	12	6,35	5,05	2,65	2,25

5 6.2. Histología (análisis cualitativo y semicuantitativo)

10 Cualitativamente el grupo Emdogain® mostró la regeneración de un hueso maduro y laminar separado del nuevo cemento por un ligamento periodontal bien organizado. En general los grupos PEG-Ek y PEG-Ec demostraron la presencia de un nuevo hueso no maduro y densamente vascularizado que parecía mantenerse en el lugar donde las 2 matrices de PEG habían sido posicionadas durante la cirugía (ver figuras 7 y 8). Se observó que en el caso de PEG-Ec (CMC) la presencia de ligamento periodontal fue equivalente a las encontradas en el grupo de Emdogain® (ver figuras 9 y 10). Los casos dudosos no se han tenido en cuenta en la tabla siguiente:

Tabla 9

	Número de defectos (n)	Ligamento periodontal	Porcentaje de presencia
Simulación	12	4	33%
Emdogain	12	8	66%
PEG-Ek (Alg)	36	17	47%
PEG-Ec (CMC)	48	33	68%

Cantidad de casos dudosos en términos de valoración de presencia de ligamento periodontal:

Simulación = 5

PEG-Ek = 9

Emdogain = 4

PEG-Ec = 10

15 6.3. Microrrayos X (análisis cuantitativo)

Altura de hueso

25 Todos los grupos experimentaron una ganancia de hueso significativa de al menos 2 mm. Emdogain® alcanzó el rendimiento más alto (aproximadamente 4 mm) con una significación estadística comparativamente a los dos grupos de EmdogainGeneration2 ($p < 0,005$). El grupo de simulación se comportó menos bien que Emdogain®, pero mejor que el grupo PEG-Ec o PEG-Ek. Ver también la figura 11.

Area ósea

30 En los cuatro grupos se regeneró una cantidad respetable de hueso (aproximadamente 3 mm²) sin diferencia estadística alguna entre las cuatro condiciones.

Tabla 10

	Número de defectos (n)	Ganancia de altura de hueso (mm)	Area (mm ²)
Simulación	6	2,87 (+/- 1,51)	2,54 (+/- 1,1)
Emdogain	8	3,85 (+/- 0,84)	2,99 (+/- 1,36)
PEG-Ek (Alg)	28	2,26 (+/- 0,95)	2,97 (+/- 2,17)
PEG-Ec (CMC)	30	2,28 (+/- 0,89)	3,28 (+/- 2,21)

35 7. Discusión

En términos de altura ósea Emdogain® se comportó de acuerdo con los resultados existentes y literatura ya publicada. El grupo de simulación mostró mejores resultados que EmdogainGeneration2.

40 PEG-Ec mostró una presencia de ligamento periodontal equivalente a Emdogain®, pero solamente en una longitud que se puede estimar aproximadamente en alrededor de 2 mm.

Aunque las morfologías de las estructuras óseas regeneradas eran diferentes entre los dos PEG-Ec o PEG-Ek (ver por ejemplo figura 12), se encontró que el uso de PEG-Ec y PEG-Ek dio por resultado la formación de una cantidad de hueso similar a las regeneradas por Emdogain®. Se hizo la hipótesis de que la regeneración de este hueso

nuevamente formado tuvo lugar realmente dentro de las dos matrices de PEG suplementadas con EMD. Entonces el volumen y posición de estas matrices en el día de la implantación pudo actuar sobre el volumen y la altura de la correspondiente regeneración ósea.

5 **Ejemplo 6**

Evaluación de una nueva formulación de derivado del esmalte activo (PEG-EMD) para regeneración periodontal. Un estudio experimental de defectos de bifurcación de clase 3 en perros.

1.10 **1. Técnica y fundamentos**

El presente estudio se destina a seguir uno piloto (“Evaluación de Emdogain®Generation2: un estudio piloto en un modelo de dehiscencia periodontal en minicerdos”) donde se ha manifestado lo siguiente:

15 “Aunque las morfologías de las estructuras de hueso regenerado eran diferentes entre los dos tipos de Emdogain®Generation2 y Emdogain®, se encontró que el uso de PEG-Ec y PEG-Ek (ambos llamados PEG-EMD) dio por resultado la formación de una cantidad de hueso similar a las regeneradas por Emdogain®. Se hizo la hipótesis de que la regeneración de este hueso nuevamente formado tuvo lugar realmente dentro de las dos matrices de PEG suplementadas con EMD. Por tanto el volumen y posición de estas matrices en el día de la implantación pudieron actuar sobre el volumen y la altura de la correspondiente regeneración ósea”

20 **2. Hipótesis**

PEG-EMD induce una regeneración periodontal (hueso, ligamento) que no es inferior a la regeneración periodontal obtenida por el uso de Emdogain® cuando se aplica en el tratamiento de defectos de bifurcación (clase 3 Hamp).

25 **3. Objetivos**

3.1. Objetivo principal

El objetivo principal de este estudio será demostrar en un modelo de perro que PEG-EMD induce cuantitativamente mayor regeneración ósea que Emdogain® cuando se usa para el tratamiento de defectos de bifurcación de clase 3.

30 **3.2. Objetivos suplementarios**

Como un segundo objetivo se demostrará que la regeneración del ligamento periodontal tras la aplicación de PEG-EMD no es inferior a las obtenidas usando Emdogain® en el modelo anteriormente citado.

35 **5. Variables**

4.1. Variable principal

La diferencia en altura del nuevo hueso desarrollada entre la línea de base y los puntos extremos y comparativamente entre los grupos de prueba (PEG-EMD) y los grupos de controles positivos (Emdogain®).

40 **4.2. Variable secundaria**

La presencia de un ligamento periodontal que recubre la superficie en al menos una raíz que circunda la bifurcación.

45 **4.3. Variable terciaria**

Datos cualitativos que dan, cuando se reúnen, una descripción completa del hueso, ligamento periodontal, cemento y estructuras de tejidos blandos.

5. Modelo y organización animal

5.1. Modelo animal

50 Perros Hound, de aproximadamente 16 meses de edad y pesando aproximadamente 25 kgs

Las extracciones de P1 y M1, P2 y P3 permanecerán en su lugar. 3 meses más tarde: creación de un defecto de bifurcación de 5 mm de altura en P2 y P3 (Koo et al., 2004). (Ver figura 13 para un típico sistema de montaje quirúrgico. En el dibujo cada flecha corresponde a 5 mm.)

55 **5.2. Organización animal**

El alojamiento animal, procedimientos quirúrgicos y seguimiento se realizarán de acuerdo con las normas GLP en las siguientes quirúrgicas experimentales: BiomatechNAMSAs, Chasse sur Rhone (Lyon), Francia.

60 **6. Resultados esperados y cálculo de la potencia**

La literatura describe que la altura media del defecto dentro de la bifurcación de clase 3 en la línea de base es 4,7 mm (+/- 0,2). Se espera que la curación espontánea después de 4 semanas da por resultado una ganancia de altura de hueso de 1,8 mm (+/- 0,3). (Koo et al., 2004) → grupos de controles negativos: blanco y PEG

65

Un resultado similar se espera después de 4 semanas del grupo de controles (Emdogain®). Después de 2 y 4 meses el aumento debe permanecer limitado, aproximadamente 1,5 mm (+/- 0,5)

5 El grupo de prueba (PRG-EMD) debe mostrar una ganancia de hueso de 2,0 mm (+/- 0,5) después de 4 semanas, 2,5 mm (+/- 0,5) después de 2 meses y 3,0 mm (+/- 1,0) después de 4 meses.

7. Materiales y Métodos

7.1 Materiales

10 **7.1.1. Material de prueba**
 PEG-EMD:
 Vial que contiene 72 mg de acrilato de PEG 15k de 4-brazos liofilizado
 Jeringa que contiene 300 µl de disolución de 12 mg de PEG-tiol 2k de 4-brazos y 5,2 mg de EMD en ácido acético
 15 acuoso al 0,05% en peso.
 Jeringa que contiene 680 ± 10 mg de trietanolamina/HCl acuosa 0,05 M, pH 8,5 ± 0,1, que contiene 3,6% en peso de Cekol 10'000.
 Concentración final de EMD en PEG: 4,9 mg/ml.

20 **7.1.2. Control positivo**
 Emdogain®
 Concentración de EMD en PGA: 30 mg/ml

25 **7.1.3. Control negativo**
 Vacío
 PEG

30 **7.1.4. Material complementario**
 Sin material complementario

7.2. Métodos

7.2.1. Diseño de estudio y calendario de trabajo
 t 0:
 35 Extracciones de P1 y M1
 t 3 meses: pulimento de la cresta alveolar, creación de defecto de bifurcación de clase 3 en P2 y P3
 t 4 meses: sacrificio después de 1 mes de tiempo de observación
 40 t 5 meses: sacrificio después de 2 meses de tiempo de observación
 t 7 meses: sacrificio después de 4 meses de tiempo de observación

45 **7.2.2. Fase pre-quirúrgica**
 Extracción de dientes,
 Tiempo de curación: 3 meses

50 **7.2.3. Fase quirúrgica**
 Creación de dos defectos de bifurcación de clase 3 en cada lado mandibular por animal.
 Relleno del defecto de bifurcación con material de control o de prueba.
 La sutura es crítica

55 **7.2.4. Fase post-quirúrgica**
 Retirada de suturas después de 14 días de curación.
 6 semanas después de la cirugía, control de placa post-operativo.

60 **7.2.5. Observaciones y análisis**
 Tomografía microcomputarizada, histología e histomorfometría

8. Puntos finales y procedimiento terminal

Los animales serán sacrificados en los meses 1, 2 y 4 después de la cirugía.

65

5

LISTA DE REFERENCIAS

1. Altschul, S.F. et al (1990)
2. Aoki, et al., *Thombosis and Haemostasis*, 39:22-31 (1978)
- 10 3. Aoki, N., *Progress in Cardiovascular Disease*, 21:267-286, 1979
4. Besson et al., (1996) *Anal. Biochem.* 237:216-223
5. Carey, *Annual Review of Physiology*, 53:161-177, 1991
6. Coombs et al., (1998) *J. Biol. Chem.* 273:4323-4328
7. Devereux, J et al (1994)
- 15 8. Edelman et al. (*Biomaterials* 1991 September; 12(7):619-26)
9. EP-B-0 263 086
10. EP-B-0 337 967
11. EP- 1059934
12. EP- 01201915.4
- 20 13. Francis, et al., *Blood Cells*, 19:291-307, 1993
14. Gestrelus S, Lyngstadaas SP, Hammarstrøm L. Emdogain – periodontal regeneration based on biomimicry. *Clin. Oral Invest* 4:120-125 (2000).
15. Graf, et al., *Cell*, 48:989-996, 1987;
16. Hammarström et al., 1997, *Journal of Clinical Periodontology* 24, 658-668).
- 25 17. Hata, et al., *J. Biol. Chem.* 268: 8447-8457
18. Haugen, et al., (1992). *J. Neurosci.* 12: 2034-2042
19. Hem et al., *J. Biomed. Mater. Res.* 39:266-276 (1998)
20. Ignatius, et al., *J. of Cell Biology*, 111:709-720, 1990
21. Kallapur, et al, *Adhesion Molecule* (1992) *J. Neurosci. Res.* 33: 538-548
- 30 22. Kleinman, et al., *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 272:39-45, 1989
23. Liesi, et al., *FEBS Letters*, 244:141-148, 1989
24. Lyngstadaas et al., 2001, *Journal of Clinical Periodontology* 28, 181-188
25. Lyngstadaas et al., 2001, *Journal of Clinical Periodontology* 27, 1-8
26. Martin, *Annual Review of Cellular Biology*, 3:57-85, 1987
- 35 27. Massia, et al, *J. of Biol. Chem.* 268:8053-8059, 1993
28. Netzal-Amett et al., (1991) *J. Biol. Chem.*, 266:6747-6755
29. Sakata, et al., *Journal of Clinical Investigation*, 65:290-297, 1980
30. Sambrook, J. et al.: *Molecular Cloning*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989.
31. Schense, J. C., et al. (1999) *Bioconj. Chem.* 10:75-81
- 40 32. Sierra, D.H., *Journal of Biomaterials Applications*, 7:309-352 (1993)
33. Smith et al., (1995). *J. Biol. Chem.* 270:6440-6449
34. Stryer, L. In *Biochemistry*, W. H. Freeman & Company, NY, 1975
35. Tagaki and Doolittle (1975) *Biochem.* 14:5149-5156
36. Tashiro, et al., *J. of Biol. Chem.*, 264:16174-16182, 1989
- 45 37. Ten Cate: *Oral Histology*, 1994; Robinson: *Eur. J. Oral Science*, Jan. 1998,106 Suppl. 1:282-91
38. Tyler-Cross, R., et. *Protein Science.* 3: 620-627
39. U.S. Pat. No. 5,874,500
40. U.S. Pat. No. 6,331,422
41. US 2003/0166833
- 50 42. US 2003/0187232
43. US Patent No. 4,672,032 (Slavkin)
44. Williams, et al., *Journal of Comparative Neurobiology*, 264:284-290 (1987).
45. Williams, *Neurochemical Research*, 12:851-869, 1987
46. WO 00/44808
- 55 47. WO 00/53196
48. WO 01/97834
49. WO 02/080994
50. Zucker and Katz, (1991). *Exper. Biol. Med.*: 693-702

60

65

LISTADO DE SECUENCIAS

- <110> Straumann Holding AG
- 5 < 120> Nueva formulación proteica
- <130> PD53607EP02
- 10 <140> EPC 07112740.1-2107
<141> 12-12-2005
- <140> SE 0403014-4
<141> 10-12-2004
- 15 <140> US60 / 636.686
<141> 16-12-2004
- <160> 26
- 20 <170> PatentIn versión 3.3
- <210> 1
<211> 16
<212> PRT
25 <213> artificial
- <220>
<223> péptido del dominio del sustrato de transglutaminasa
- 30 <400> 1
- Tyr Arg Gly Asp Thr Ile Gly Glu Gly Gln Gln His His Leu Gly Gly
1 5 10 15
- 35 <210> 2
<211> 5
<212> PRT
<213> artificial
- <220>
40 <223> péptido de la secuencia del sustrato de factor XIIIa
- <400> 2
- Gly Ala Lys Asp Val
1 5
- 45 <210> 3
<211> 4
<212> PRT
<213> artificial
- 50 <220>
<223> péptido de la secuencia del sustrato de factor XIIIa
- <400> 3
- 55 Lys Lys Lys Lys
1
- <210> 4
<211> 8
60 <212> PRT
<213> artificial

<210> 9
 <211> 6
 <212> PRT
 <213> artificial
 5
 <220>
 <223> secuencia del sustrato para proteasa de estromelisina
 <220>
 10 <221> amidación
 <222> 6.....6
 <400> 9
 Pro Phe Glu Leu Arg Ala
 15 1 5
 <210> 10
 <211> 5
 <212> PRT
 20 <213> artificial
 <220>
 <223> secuencia del sustrato para proteasa de elastasa
 25 <220>
 <221> amidación
 <222> 5.....5
 <400> 10
 30 Glx Ala Ala Phe Ala
 1 5
 <210> 11
 <211> 8
 35 <212> PRT
 <213> artificial
 <220>
 <223> secuencia del sustrato para proteasa de collagenasa
 40 <400> 11
 Gly Pro Leu Gly Ile Ala Gly Pro
 1 5
 45 <210> 12
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> artificial
 50 <220>
 <223> secuencia del sustrato para proteasa de t-PA
 <400> 12
 Pro His Tyr Gly Arg Ser Gly Gly
 55 1 5
 <210> 13
 <211> 9
 <212> PRT
 60 <213> artificial
 <220>

ES 2 384 273 T3

<223> secuencia del sustrato para proteasa de u-PA
 <400> 13

Pro Gly Ser Gly Arg Ser Ala Ser Gly
 1 5

5 <210> 14
 <211> 14
 <212> PRT
 10 <213> artificial

<220>
 <223> secuencia de unión a heparina de anti-trombina III

15 <400> 14

Lys Ala Phe Ala Lys Leu Ala Ala Arg Leu Tyr Arg Lys Ala
 1 5 10

20 <210> 15
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> artificial

<220>
 25 <223> factor de plaquetas 4

<400> 15

Tyr Lys Lys Ile Ile Lys Lys Leu
 1 5

30 <210> 16
 <211> 14
 <212> PRT
 <213> artificial

35 <220>
 <223> célula neural

<400> 16

40 Lys His Lys Gly Arg Asp Val Ile Leu Lys Lys Asp Val Arg
 1 5 10

<210> 17
 <211> 19
 45 <212> PRT
 <213> artificial

<220>
 <223> secuencia de unión a heparina de fibronectina

50 <400> 17

Tyr Glu Lys Pro Gly Ser Pro Pro Arg Glu Val Val Pro Arg Pro Arg
 1 5 10 15

Pro Cys Val

55 <210> 18
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> artificial

ES 2 384 273 T3

<220>
 <223> secuencia de unión a heparina de péptido

5 <400> 18

Lys Asn Asn Gln Lys Ser Glu Pro Leu Ile Gly Arg Lys Lys Thr
 1 5 10 15

<210> 19
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> artificial

<220>
 <223> secuencia de unión a heparina de bFGF

15 <400> 19

Lys Asp Pro Lys Arg Leu Tyr Arg Ser Arg Lys Tyr
 1 5 10

20 <210> 20
 <211> 6
 <212> PRT
 <213> artificial

25 <220>
 <223> secuencia de unión a heparina de aFGF

<400> 20

30 Tyr Lys Lys Pro Lys Leu
 1 5

<210> 21
 <211> 13
 <212> PRT
 <213> artificial

35 <220>
 <223> secuencia de unión a heparina de LPL

40 <400> 21

Ala Lys Arg Ser Ser Lys Met Cys Arg Lys Arg Cys Asn
 1 5 10

45 <210> 22
 <211> 5
 <212> PRT
 <213> artificial

50 <220>
 <223> dominio de unión al receptor de la cadena B1 de laminina

<400> 22

Tyr Ile Gly Ser Arg
 1 5

55 <210> 23
 <211> 5
 <212> PRT

ES 2 384 273 T3

<213> artificial

<220>
<223> dominio de unión al receptor de la cadena A de laminina

5 <400> 23

Leu Arg Gly Asp Asn
1 5

10 <210> 24
<211> 5
<212> PRT
<213> artificial

15 <220>
<223> dominio de unión al receptor de la cadena B1 de laminina

<400> 24

Pro Asp Gly Ser Arg
1 5

20 <210> 25
<211> 5
<212> PRT

25 <213> artificial

<220>
<223> secuencia de reconocimiento para células de la cadena A de laminina

30 <400> 25

Ile Lys Val Ala Val
1 5

35 <210> 26
<211> 10
<212> PRT
<213> artificial

<220>
40 <223> secuencia de reconocimiento para células de la cadena B2 de laminina

<400> 26

Arg Asn Ile Ala Glu Ile Ile Lys Asp Ile
1 5 10

REIVINDICACIONES

- 5 1. Una formulación farmacéutica y/o terapéutica para administrar una sustancia del esmalte activa, que comprende una matriz polimérica y una sustancia del esmalte activa, que comprende al menos un fragmento de amelogenina, donde la concentración de dicha sustancia del esmalte activa es aproximadamente 1 mg/ml de formulación, o menos.
- 10 2. Una formulación farmacéutica y/o terapéutica de acuerdo con la reivindicación 1, donde la concentración de la sustancia del esmalte activa es menor que 250 µg/ml.
3. Una formulación farmacéutica y/o terapéutica de acuerdo con la reivindicación 2, donde la concentración de la sustancia del esmalte activa es menor que 100 µg/ml.
- 15 4. Una formulación farmacéutica y/o terapéutica de acuerdo con la reivindicación 1, donde la concentración de la sustancia del esmalte activa es menor que 50 µg/ml.
5. Una formulación farmacéutica y/o terapéutica de acuerdo con la reivindicación 1, donde la concentración de la sustancia del esmalte activa es entre 1 µg/ml y 1 mg/ml.
- 20 6. Una formulación farmacéutica y/o terapéutica de acuerdo con la reivindicación 1, donde la concentración de la sustancia del esmalte activa es entre 10 µg/ml y 250 µg/ml.
7. Una formulación farmacéutica y/o terapéutica de acuerdo con la reivindicación 1, donde la concentración de la sustancia del esmalte activa es entre 100 µg/ml y 500 µg/ml.
- 25 8. Una formulación farmacéutica y/o terapéutica de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, que comprende una matriz polimérica y una sustancia del esmalte unida a dicha matriz por un enlace covalente o no covalente.
- 30 9. Una formulación farmacéutica y/o terapéutica de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, donde dicha matriz polimérica se forma por una reacción nucleofílica de adición entre un nucleófilo fuerte y un enlace insaturado conjugado, o un grupo insaturado conjugado.
- 35 10. Una formulación farmacéutica y/o terapéutica de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, donde dicha matriz es adecuada para crecimiento interno o migración celular.
11. Una formulación farmacéutica y/o terapéutica de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, donde dicha matriz es oclusiva de células.
- 40 12. Una formulación farmacéutica y/o terapéutica de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, donde dicha matriz está preformada.
- 45 13. Una formulación farmacéutica y/o terapéutica de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, donde dicha matriz se forma *in situ*.
14. Una formulación farmacéutica y/o terapéutica de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, donde dicha sustancia del esmalte activa es amelogenina.
- 50 15. Una formulación farmacéutica y/o terapéutica de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, donde dicha sustancia del esmalte activa está enlazada a dicha matriz debido a una reacción nucleofílica de adición de al menos un residuo de cisteína a un grupo insaturado conjugado de al menos uno de los componentes de la matriz.
- 55 16. Una formulación farmacéutica y/o terapéutica de acuerdo con la reivindicación 15, donde dicho al menos un residuo de cisteína está situado en el C-terminal de dicha sustancia del esmalte activa.
17. Una formulación farmacéutica y/o terapéutica de acuerdo con la reivindicación 15, donde dicho al menos un residuo de cisteína está situado en el N-terminal de dicha sustancia del esmalte activa.
- 60 18. Una formulación farmacéutica y/o terapéutica de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 15-17, donde dicha sustancia del esmalte activa está químicamente modificada.
- 65 19. Una formulación farmacéutica y/o terapéutica de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 15-18, donde dicha cisteína está unida a dicha sustancia del esmalte activa por la vía de una secuencia enlazante.

20. Una formulación farmacéutica y/o terapéutica de acuerdo con la reivindicación 19, donde dicha secuencia enlazante comprende una secuencia aminoacídica degradable enzimáticamente.
- 5 21. Una formulación farmacéutica y/o terapéutica de acuerdo con la reivindicación 19, donde dicho enlazante comprende una secuencia para degradación proteolítica.
22. Una formulación farmacéutica y/o terapéutica de acuerdo con la reivindicación 19, donde dicha secuencia es una secuencia degradable por plasmina.
- 10 23. Una formulación farmacéutica y/o terapéutica de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 19-22, donde dicha secuencia enlazante incluye además una secuencia que es degradable por hidrólisis no específica.
24. Una formulación farmacéutica y/o terapéutica de acuerdo con la reivindicación 23, donde dicha secuencia comprende un enlace éster.
- 15 25. Una formulación farmacéutica y/o terapéutica de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 19-24, donde dicho enlazante comprende un sustrato para degradación polisacáridica.
- 20 26. Una formulación farmacéutica y/o terapéutica de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-14, donde dicha sustancia del esmalte activa está incorporada a la matriz polimérica a través de un dominio sustrato de transglutaminasas.
27. Una formulación farmacéutica y/o terapéutica de acuerdo con la reivindicación 26, donde dicho dominio de transglutaminasas es un dominio sustrato de Factor XIIIa.
- 25 28. Una formulación farmacéutica y/o terapéutica de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-14, donde dicha matriz polimérica se modifica a través de la inclusión de al menos una heparina y/o fragmento de unión a heparina.
- 30 29. Una formulación farmacéutica y/o terapéutica de acuerdo con la reivindicación 28, donde dicha sustancia del esmalte activa está unida covalentemente o no covalentemente a dicha matriz polimérica a través de al menos un fragmento de unión a heparina.
- 35 30. Una formulación farmacéutica y/o terapéutica de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-29, donde dicha matriz polimérica comprende poli(etilenglicol).
31. Una formulación farmacéutica y/o terapéutica de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-29, donde dicha matriz polimérica comprende fibrina.
- 40 32. Una formulación farmacéutica y/o terapéutica de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, para usar como un medicamento.
33. Uso de una formulación farmacéutica y/o terapéutica de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-31, para la fabricación de un medicamento para reparar tejido mineralizado tal como hueso, cartílago y dientes.
- 45 34. Uso de una formulación farmacéutica y/o terapéutica de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-31, para la fabricación de un medicamento para reparación tisular de tejido no mineralizado tal como tejido blando y mucosa.
- 50 35. Uso de una formulación farmacéutica y/o terapéutica de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-31, para la fabricación de un medicamento para el tratamiento de una enfermedad que implica inflamación.
36. Uso de una formulación farmacéutica y/o terapéutica de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-31, para la fabricación de un medicamento para el tratamiento de una enfermedad que implica infección.
- 55 37. Una composición farmacéutica y/o terapéutica que comprende una formulación farmacéutica y/o terapéutica de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-32, que comprende además una composición farmacéutica y/o terapéutica que comprende 30 mg de proteína de la matriz del esmalte, y 1 ml de alginato de propilenglicol, siendo la relación en peso aproximadamente 80/8/12 entre los principales picos proteicos a 20, 14 y 5 kDa, respectivamente.
- 60

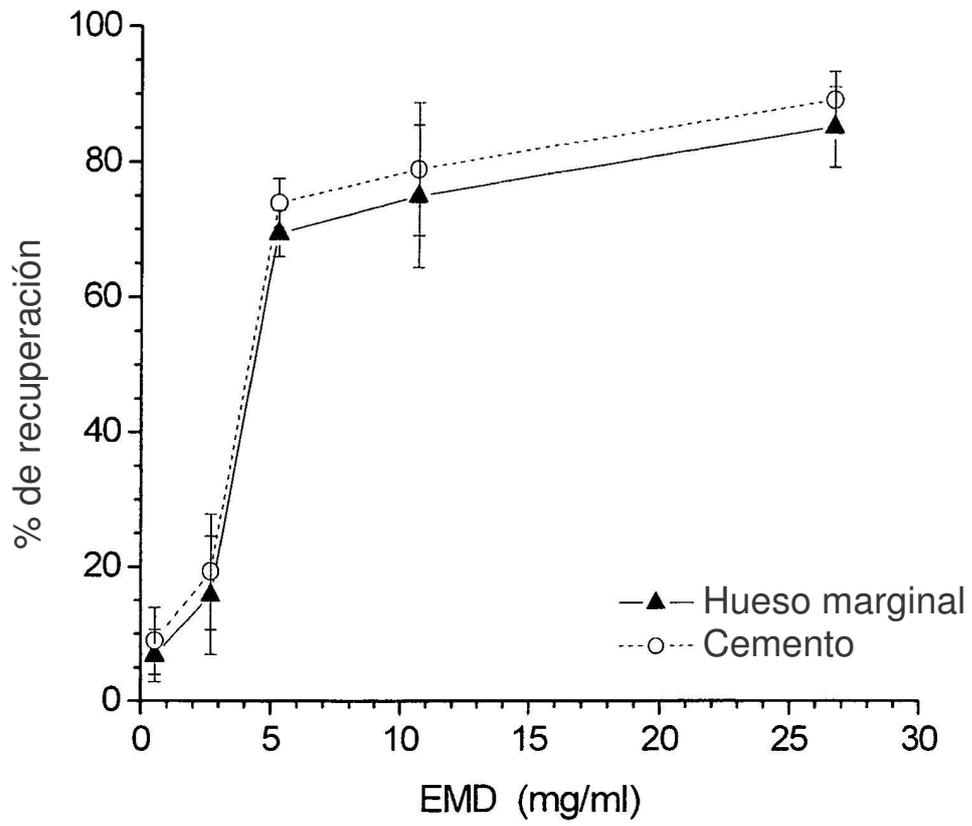


Figura 1

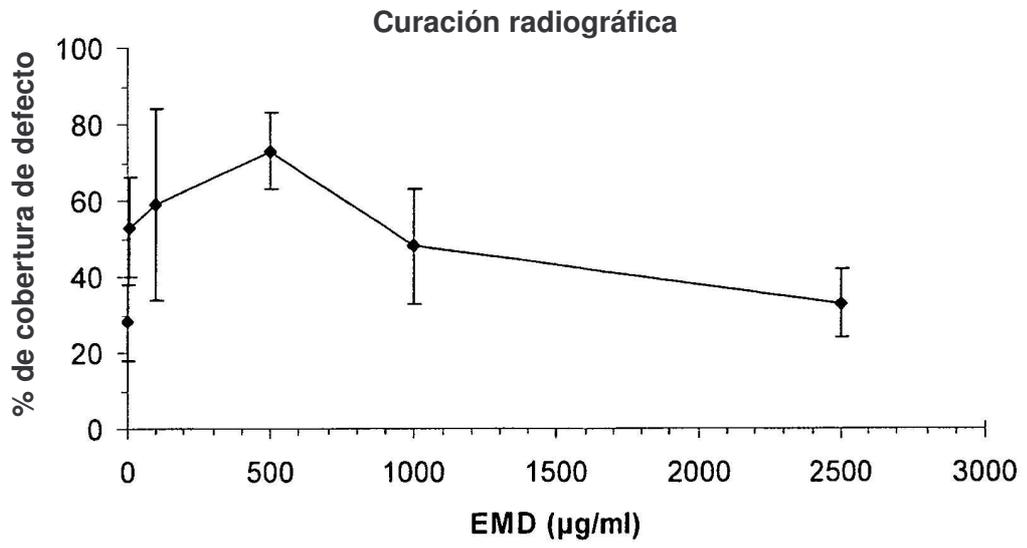


Figura 2

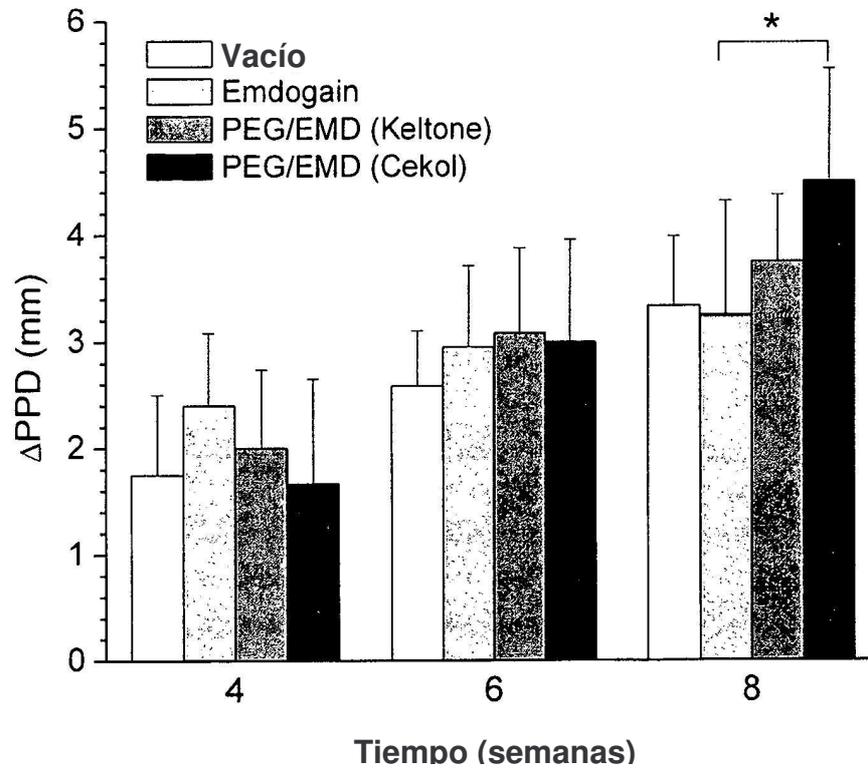


Figura 3

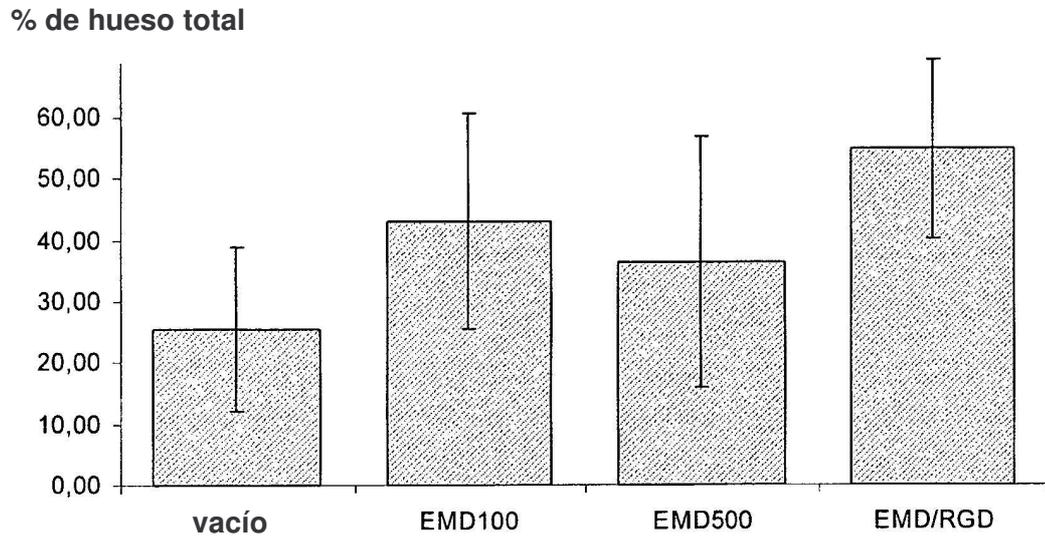


Figura 4

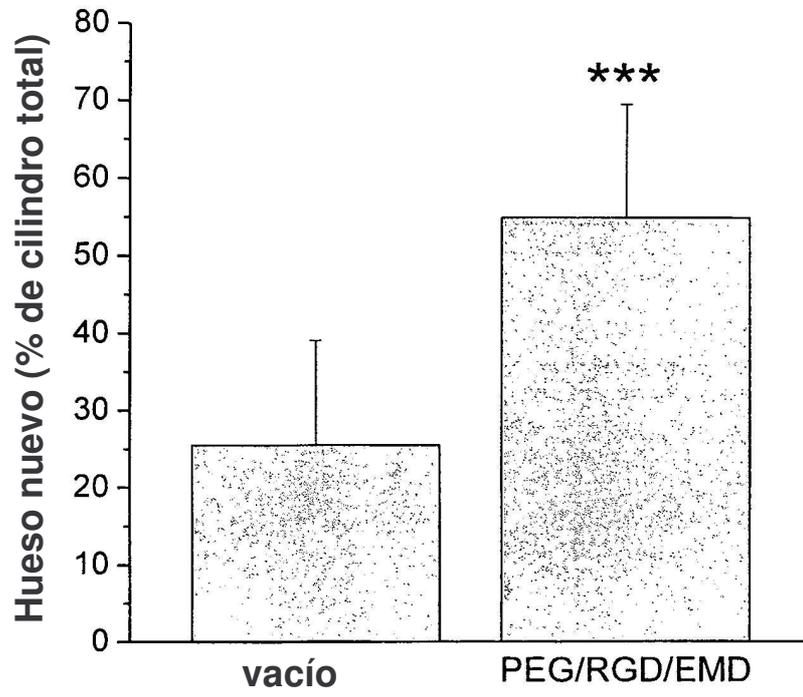


Figura 5



Figura 6

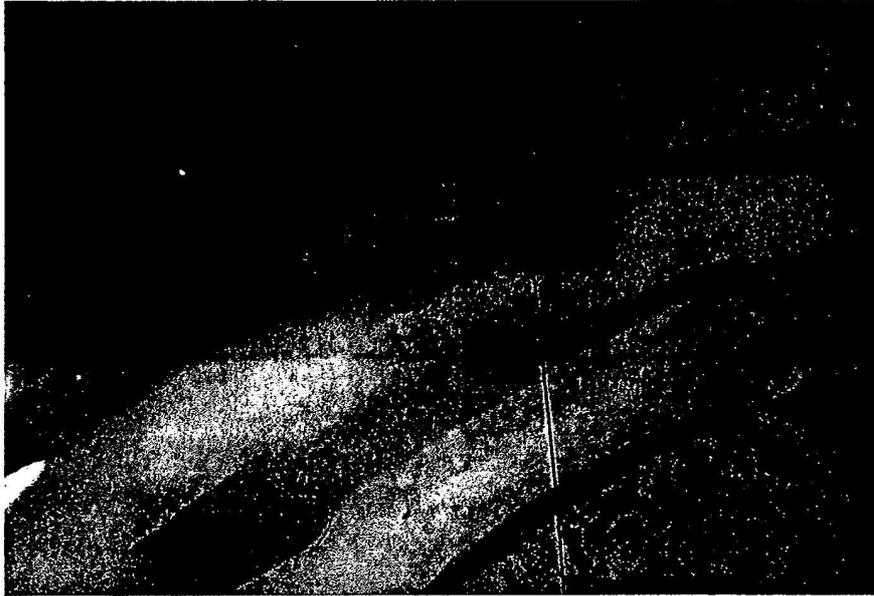


Figura 7A

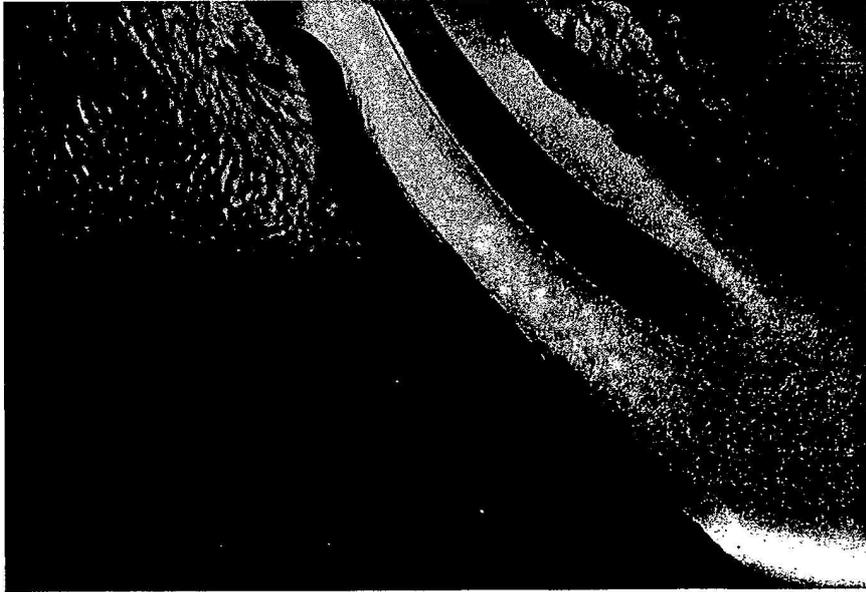


Figura 7B

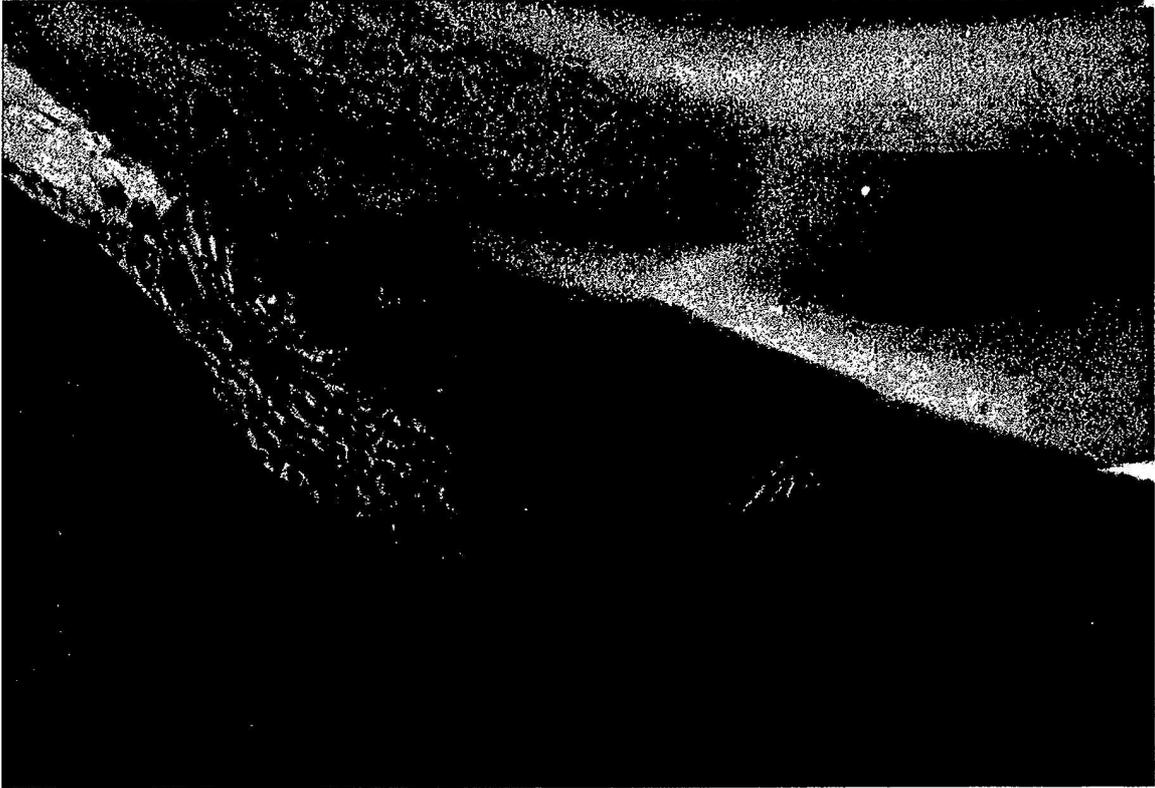


Figura 8



Figura 9

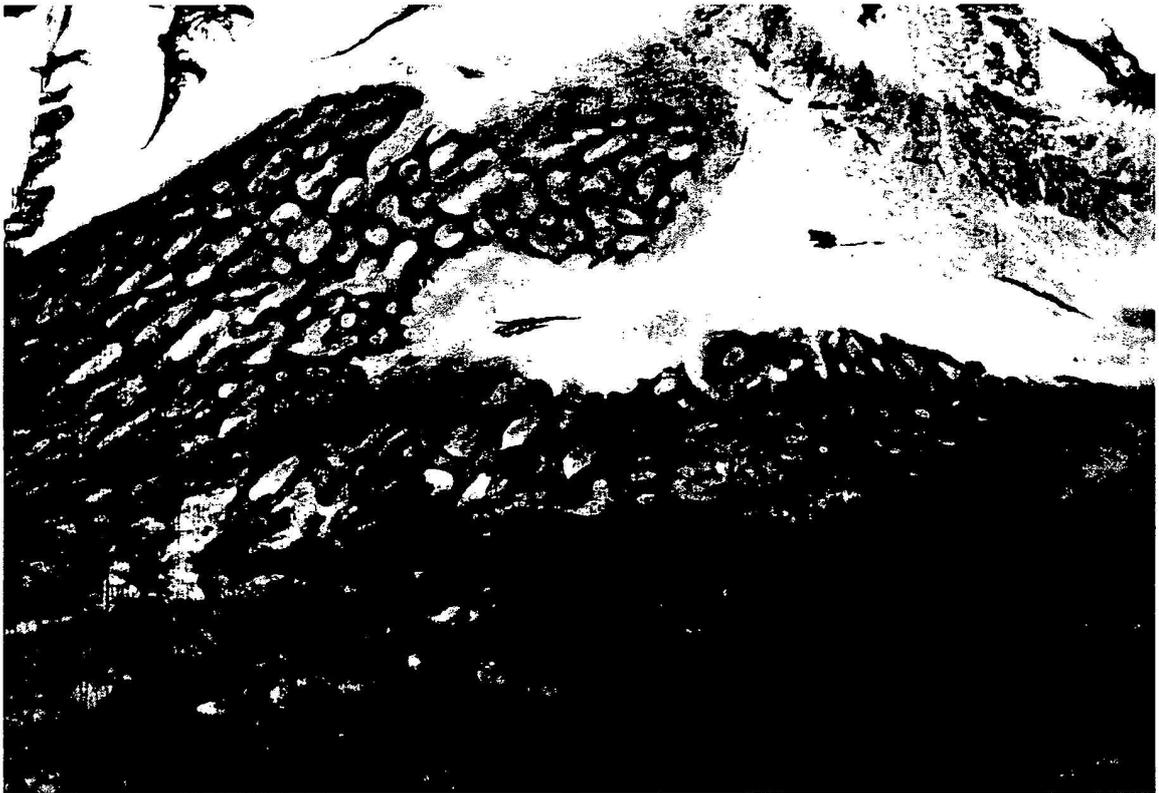


Figura 10

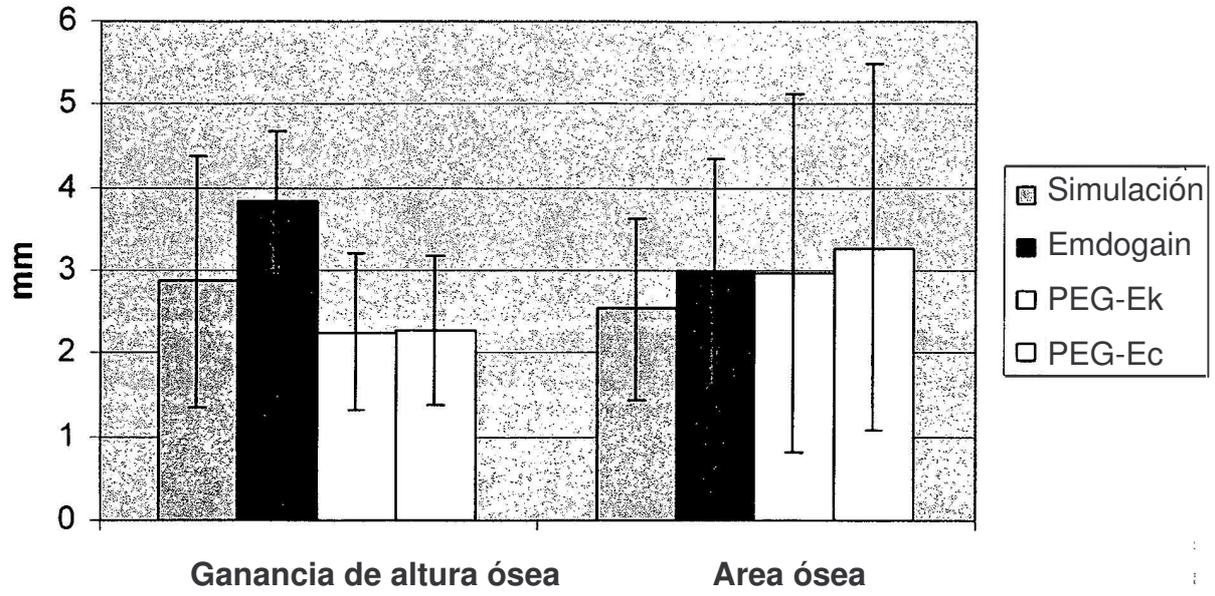


Figura 11

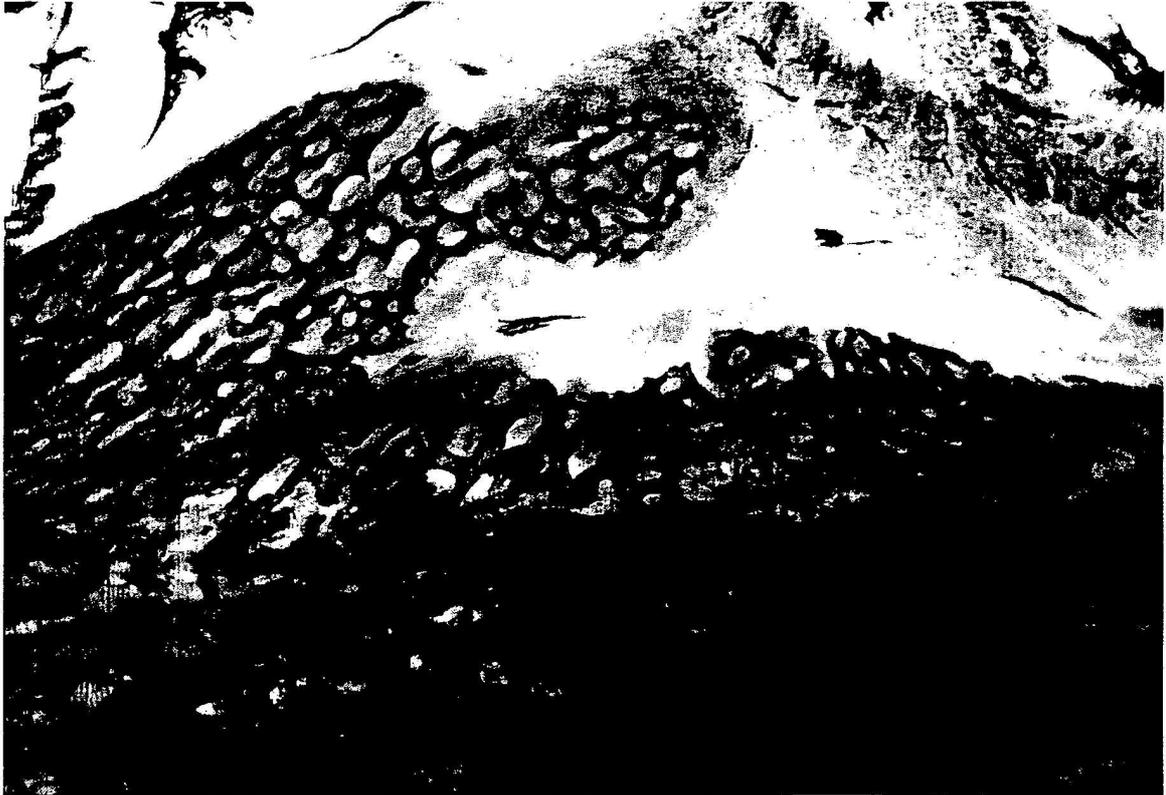


Figura 12

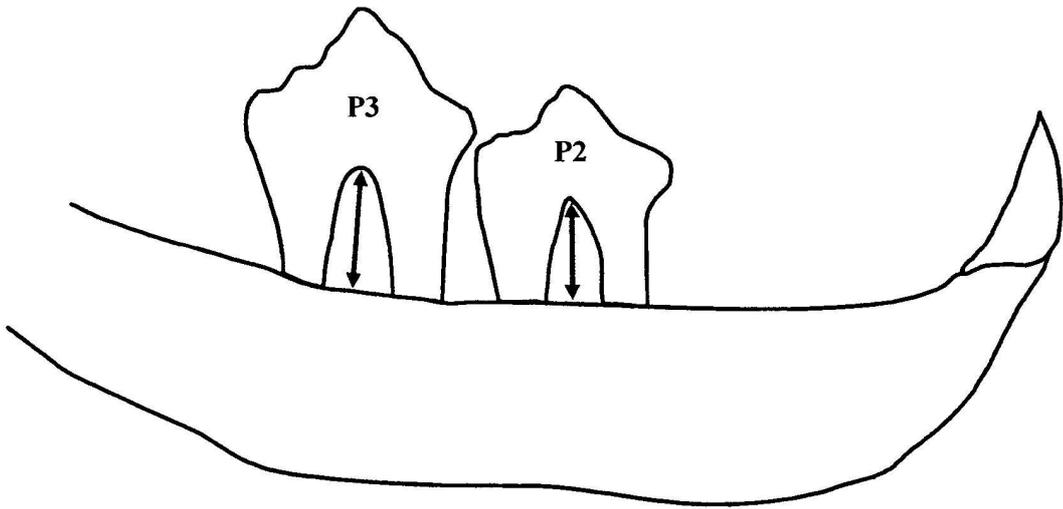


Figura 13