

(19)



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS
ESPAÑA



(11) Número de publicación: **2 405 333**

(51) Int. Cl.:

A61K 38/22 (2006.01)
A61L 27/00 (2006.01)
A61P 1/02 (2006.01)

(12)

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

(96) Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **19.10.2006 E 06822285 (0)**

(97) Fecha y número de publicación de la concesión europea: **20.02.2013 EP 1952821**

(54) Título: **Agente terapéutico para la regeneración del complejo dentina-pulpa dental**

(30) Prioridad:

19.10.2005 JP 2005305076

(45) Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
30.05.2013

(73) Titular/es:

OSAKA UNIVERSITY (50.0%)
1-1, YAMADAOKA
SUITA-SHI, OSAKA 565-0871, JP y
KAKEN PHARMACEUTICAL CO., LTD. (50.0%)

(72) Inventor/es:

MURAKAMI, SHINYA y
SHIMABUKURO, YOSHIO

(74) Agente/Representante:

DE ELZABURU MÁRQUEZ, Alberto

ES 2 405 333 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

Agente terapéutico para la regeneración del complejo dentina-pulpa dental.

5 **Campo técnico**

La presente invención se refiere a un agente terapéutico para el uso en un método de regeneración de un complejo dentina-pulpa que se puede utilizar para la terapia médica de la pulpa de un diente con caries dental avanzada y similares.

10

Técnica antecedente

15 La caries dental es una enfermedad infecciosa provocada por bacterias orales que producen ácido, tales como Streptococcus mutans y Streptococcus sobrinus, caracterizada por la pérdida de parénquima dental debida a un desequilibrio entre la descalcificación y la recalcificación. En un método terapéutico disponible actualmente para los dientes con caries dental que ha alcanzado la dentina y la pulpa, se aplica una preparación de hidróxido cálcico como agente de recubrimiento de la pulpa en la pulpa expuesta, y a continuación se rellena con cemento dental y similares. Sin embargo, en este método, se produce una capa necrótica sobre la cara de la pulpa en contacto con el hidróxido cálcico, y el tejido pulpar dañado no se regenera nunca, con una ligera formación de dentina terciaria bajo 20 la capa necrótica.

25 Tanto la dentina como la pulpa son tejidos derivados de células madre mesenquimatosas, pero en el pasado se consideraron tejidos diferentes, el primero se consideró un tejido duro, y el segundo un tejido blando. Los estudios recientes los han reconocido como un tejido embriológicamente y funcionalmente integrado, denominado "complejo dentina-pulpa". Se sabe que los odontoblastos de la pulpa extienden sus prolongaciones hacia los túbulos dentinales, y desempeñan un papel como sensores para los estímulos exógenos; la morfología fisiológica y la función del complejo dentina-pulpa están profundamente implicadas en la supervivencia del diente. Por esta razón, el pronóstico con la terapia disponible actualmente descrita anteriormente no es bueno en absoluto.

30 El factor de crecimiento de fibroblastos básico (más adelante en la presente memoria abreviado a veces como bFGF) es un factor de crecimiento celular peptídico que se ha confirmado que está presente en la hipófisis, cerebro, retina, cuerpo lúteo, glándula suprarrenal, riñón, placenta, próstata, timo, condrosarcoma, y macrófagos ("Saibou Seicho Inshi Part II", editado por la Japanese Tissue Culture Association, Asakura Shoten, 1987, págs. 15-20). El factor de crecimiento de fibroblastos básico se nombró inicialmente por su potente acción proliferativa en los 35 fibroblastos, tales como células BALB/c3T3 (D. Gospodarowicz, Nature, vol. 249, pág. 123 (1974)), pero más tarde se demostró que estimulaba la proliferación de la mayoría de las células mesodérmicas, en particular las células endoteliales vasculares (D. Gospodarowicz, National Cancer Institute Monograph, vol. 48, pág. 109 (1978)), y que estimulaba la proliferación de las células satélite del músculo esquelético (R. E. Allen, Experimental Cell Research, vol. 152, pág. 154 (1984)). En los últimos años, ha habido aplicaciones clínicas del factor de crecimiento de fibroblastos básico en el tratamiento de heridas, y aplicaciones del factor de crecimiento de fibroblastos básico para 40 la reparación de vasos sanguíneos basada en la acción angiogénica y similares.

45 Se ha informado que el factor de crecimiento de fibroblastos básico induce la proliferación de las células de la pulpa, y que tiene una acción reguladora sobre la diferenciación de las células de la pulpa hasta odontoblastos *in vitro* (M. Nakashima, Archs Oral Biol., vol. 37 (3), págs. 231-236 (1992) y K. Nakao, Biochem Biophys Res Commun, vol. 325, págs. 1052-1059 (2004)); se ha informado que TGF-β1 tiene un efecto significativo en la formación de dentina reparada, sin ningún efecto observado *in vivo* del factor de crecimiento de fibroblastos básico (D. Tziaras, Archs Oral Biol., vol. 43, págs. 431-444 (1998) y C.-C. Hu, J. Endodontics, vol. 24(11), págs. 744-751 (1998)).

50 Por ejemplo, en el documento WO94/27630 se describe como preparación del factor de crecimiento de fibroblastos básico una preparación de gel de gelatina reticulada que contiene factor de crecimiento de fibroblastos básico, útil para el tratamiento de una enfermedad ósea; El documento JP-A-7-233085 expone que el factor de crecimiento de fibroblastos básico y/o un homólogo del mismo posee un efecto estimulador excelente sobre la neogénesis o la regeneración del tejido cartilaginoso, y es útil para la reparación del tejido cartilaginoso. El documento JP-A-7-17876 55 describe un agente terapéutico para la enfermedad periodontal que comprende un factor de crecimiento de fibroblastos básico y/o un homólogo del mismo. Además, el documento WO03/082321 describe una preparación viscosa para uso dental que comprende un factor de crecimiento de fibroblastos básico, útil para el tratamiento de una enfermedad periodontal. Se espera que el agente terapéutico de la enfermedad periodontal descrito en el documento JP-A-7-17876 tenga aplicación para la regeneración de la pérdida de dentina por caries dental (párrafo 60 [0035] en la descripción del documento JP-A-7-17876). Sin embargo, el documento JP-A-7-17876 no proporciona ninguna descripción o sugerencia con respecto al tratamiento de la pérdida de parénquima dental debida a caries dental provocada por bacterias productoras de ácido tales como Streptococcus mutans, desgaste o lesión dental; existe la necesidad de desarrollar un agente terapéutico capaz de tratar radicalmente la pérdida de parénquima dental debida a una caries dental provocada por bacterias productoras de ácido, desgaste o lesión dental.

65 Takase T: "A Histopathological Study of alpha-tricalcium Phosphate Cement Containing Growth Factor as Direct Pulp

Capping Agent", Nichidai Koku Kagaku - Nihon University Journal of Oral Science, Nihon Daigaku. Matsudo Shigakubu, Matsudo, JP, vol. 25, 1 de enero de 1999, páginas 415-426, se refiere a un estudio histopatológico en perros, y describe el uso de un cemento de fosfato tricálcico que contiene bFGF como agente de recubrimiento directo de la pulpa.

- 5 El documento JP 06 340555 A se refiere a un agente de recubrimiento de la pulpa, que se supone que tiene una propiedad de regeneración de la dentina y que comprende una proteína formadora de hueso como ingrediente activo.
- 10 Kadokura H: "Effects of Basic FGF on Differentiation of Odontoblast-like Cells in Rat Dental Pulp Cells", Nihon Shika Hozongaku Zasshi-Japanese Journal of Conservative Dentistry, Nihon Shika Hozon Gakkai, Tokio, JP, vol. 45, nº. 1, 1 de enero de 2002, páginas 106-118, es un artículo que sugiere que bFGF induce la diferenciación de las células de la pulpa y la formación de dentina.

15 **Descripción de la invención**

Un objetivo de la presente invención es proporcionar un fármaco capaz de actuar sobre células madre mesenquimatosas indiferenciadas y odontoblastos que están presentes en el tejido pulpar para reconstruir de manera positiva un complejo dentina-pulpa.

- 20 Los presentes inventores investigaron diligentemente en vista de los problemas anteriormente descritos, y descubrieron que mediante la administración de un factor de crecimiento de fibroblastos básico a un defecto en un complejo dentina-pulpa o dentina debido a una caries dental y similares, no solamente se induce la proliferación de las células de la pulpa y se regenera el tejido pulpar, sino que también se activa la proliferación y la inducción de la diferenciación de odontoblastos, y que se produce dentina de nuevo, por lo que se reconstruye el complejo dentina-pulpa que tiene una función intrínseca, y desarrollaron la presente invención.

Por lo tanto, la presente invención proporciona lo siguiente:

- 30 [1] Un agente terapéutico para el uso en un método de regeneración de un complejo dentina-pulpa con la morfología fisiológica, en el que la dentina se localiza en el lado de la cavidad de la caries dental, y la pulpa se localiza en el lado de la pulpa intrínseca, y las prolongaciones de los odontoblastos se extienden hacia la dentina, que comprende del 0,05 al 0,5% en peso de un factor de crecimiento de fibroblastos básico y/o un homólogo del mismo como ingrediente activo, e hidroxipropilcelulosa o gel de gelatina reticulada como vehículo,
- 35 en el que el homólogo es
- [I] un polipéptido que consiste en una secuencia de aminoácidos que tiene 1 a 6 aminoácidos sustituidos por tipo(s) diferente(s) de aminoácidos, y que tiene la actividad biológica del factor de crecimiento de fibroblastos básico; o
- 40 [II] un polipéptido en el que se añade un segmento de aminoácidos adicional que consiste en 1 a 12 aminoácidos y que no reduce la actividad biológica del factor de crecimiento de fibroblastos básico o el polipéptido de [I] en el extremo N-terminal y/o C-terminal del factor de crecimiento de fibroblastos básico o el polipéptido de [I], y
- 45 que se administra de manera tópica en la cara expuesta de la pulpa o el fondo del defecto de la dentina.

[2] El agente terapéutico para el uso en un método de regeneración de un complejo dentina-pulpa con la morfología fisiológica de [1], en el que el factor de crecimiento de fibroblastos básico es el factor de crecimiento de fibroblastos básico humano.

- 50 [3] El agente terapéutico para el uso en un método de regeneración de un complejo dentina-pulpa con la morfología fisiológica de [1] o [2], que es para el uso en el tratamiento de un diente con una pérdida de parénquima dental debida a una caries dental, desgaste o lesión dental.
- 55 [4] El agente terapéutico para el uso en un método de regeneración de un complejo dentina-pulpa con la morfología fisiológica de [3], en el que la caries dental ha alcanzado la pulpa.
- [5] El agente terapéutico para el uso en un método de regeneración de un complejo dentina-pulpa con la morfología fisiológica de cualquiera de [1] a [4], que es un agente de recubrimiento de la pulpa.

60 **Breve descripción de los dibujos**

La FIG. 1 es un gráfico que muestra el efecto de bFGF sobre la dentinogénesis. -: No se formó dentina terciaria, ±: casi no se formó dentina terciaria, +: se formó una pequeña cantidad de dentina terciaria, 2+: se formó una cantidad moderada de dentina terciaria, 3+: se formó notablemente dentina terciaria.

La FIG. 2 muestra microfotografías ópticas de (A) una muestra sin tratamiento, (B) una muestra tratada con gel de gelatina reticulada solamente, (C) una muestra tratada con bFGF, y (D) una muestra tratada con Dycal, tras tinción con HE, en un ensayo de regeneración del complejo dentina-pulpa después de cirugía de exposición de la pulpa en un perro.

5 La FIG. 3 muestra microfotografías ópticas de gran aumento de (A) y (B) muestras tratadas con bFGF y (C) una muestra tratada con Dycal, tras tinción con HE, en un ensayo de regeneración del complejo dentina-pulpa después de cirugía de exposición de la pulpa en un perro. La flecha en (C) indica la dentina formada en la pulpa.

10 La FIG. 4 muestra una microfotografía óptica de una muestra tratada con bFGF, tras tinción con HE, en un ensayo de regeneración del complejo dentina-pulpa después de cirugía de un defecto de la dentina sin exposición de la pulpa en un perro.

Mejor modo de llevar a cabo la invención

15 La presente invención proporciona un agente terapéutico para el uso en un método de regeneración de un complejo dentina-pulpa, que comprende un factor de crecimiento de fibroblastos básico y/o un homólogo del mismo como ingrediente activo.

20 En la presente invención, el complejo dentina-pulpa se refiere a una estructura compuesta constituida por tejido pulpar capaz de producir dentina, y la dentina que incluye el tejido pulpar, que se considera una única unidad funcional.

25 En la presente invención, "tratamiento regenerativo" se refiere a una forma de tratamiento que va acompañada por la regeneración del complejo dentina-pulpa perdido por una caries dental o desgaste dental.

30 El factor de crecimiento de fibroblastos básico (bFGF o FGF-2: abreviado más adelante en la presente memoria como bFGF) y un homólogo del mismo se obtienen mediante aislamiento y purificación de un producto que se da de manera natural o un producto de un microorganismo o de células cultivadas mediante ingeniería genética, o mediante la modificación química o biológica de los mismos.

35 El bFGF natural se exemplifica mediante los derivados de mamíferos. Los mamíferos incluyen el ser humano, mono, perro, cerdo, oveja, ganado, caballo y similares. bFGF se puede obtener de estos mamíferos mediante un método conocido habitual, y también se pueden usar los que están disponibles comercialmente. El bFGF usado en la presente invención es preferiblemente bFGF humano o un homólogo del mismo.

40 En el agente terapéutico regenerativo de la presente invención, se puede usar un homólogo de bFGF como ingrediente activo. En la presente memoria, un homólogo de bFGF significa el polipéptido de [I] o [II] siguiente:

45 [I] Un polipéptido que consiste en sustancialmente la misma secuencia de aminoácidos que el bFGF producido en un mamífero particular. Sustancialmente la misma secuencia de aminoácidos significa una secuencia de aminoácidos que tiene 1 a 6 aminoácidos sustituidos por tipo(s) diferente(s) de aminoácidos, y que tiene la actividad biológica de bFGF.

50 [II] Un polipéptido en el que se añade un segmento de aminoácidos adicional en el extremo N-terminal y/o C-terminal de bFGF producido por un mamífero particular, o en el extremo N-terminal y/o C-terminal del polipéptido de [I] anterior. El segmento de aminoácidos adicional significa uno que consiste en 1 a 12 aminoácidos, y que no reduce la actividad biológica de bFGF o la actividad biológica del polipéptido de [I] anterior.

55 El bFGF humano es un polipéptido que consiste en 146 aminoácidos; en el agente terapéutico regenerativo de la presente invención, como homólogo de bFGF humano (el homólogo de [I] anterior), por ejemplo, se puede usar el polipéptido que consiste en 146 aminoácidos descrito en el documento JP-A-2-504468. En este polipéptido, la cisteína (Cys) de la posición 69 y la cisteína (Cys) de la posición 87 que constituyen la secuencia de aminoácidos de bFGF humano están sustituidas respectivamente por serina (Ser).

60 Como homólogo de [II] anterior, por ejemplo, se puede usar un polipéptido que consiste en 155 aminoácidos descrito en el documento JP-A-63-500843. En este polipéptido, se añade un segmento que consiste en 9 aminoácidos en el extremo N-terminal de bFGF humano.

65 Se puede usar un polipéptido que consiste en 147 aminoácidos en el que se añade metionina (Met) en el extremo N-terminal y un polipéptido que consiste en 157 aminoácidos descrito en el documento JP-A-63-501953, en el que se añade un segmento que consiste en 11 aminoácidos en el extremo N-terminal.

Un bFGF especialmente preferible es trafermina (recombinante genético).

65 En el agente terapéutico regenerativo de la presente invención, se puede usar un tipo de bFGF solo, y se pueden

usar tipos diversos del mismo en combinación. Además, como se describió anteriormente, aunque el homólogo de bFGF incluye tipos diversos, tales homólogos se pueden usar también solos, o en combinación.

Debido a que la cantidad residual de bFGF en los organismos vivos es una cantidad insignificante, desde el punto de vista de un suministro comercialmente estable del agente terapéutico regenerativo de la presente invención, se usa preferiblemente en particular el bFGF producido por un microorganismo tal como *Escherichia coli*, o producido en células cultivadas mediante ingeniería genética o un homólogo de las mismas. Cuando se incorpora un gen para la producción de bFGF o un homólogo del mismo (en la presente memoria, en general el polipéptido de [I] anterior) en un microorganismo o células cultivadas, el producto de este microorganismo o células cultivadas es en general un polipéptido en el que se añade un segmento de aminoácidos adicional en el extremo N-terminal y/o C-terminal de bFGF, o en el extremo N-terminal y/o C-terminal del polipéptido de [I] anterior, es decir, el polipéptido de [II] descrito anteriormente.

El agente terapéutico regenerativo de la presente invención comprende hidroxipropilcelulosa o gel de gelatina reticulada como vehículo.

Se puede preparar en forma de una preparación viscosa, agente gelificante, líquidos, pomadas, emulsiones, infusiones, escayolas, inyecciones, polvos y similares, combinando bFGF y/o un homólogo del mismo con un vehículo farmacéuticamente aceptable, por ejemplo, un disolvente, agente isotónico, emulsionante, agente de suspensión, estabilizante, espesante, agente de relleno para uso dental y similares, mediante la tecnología de preparación habitual. Además, el agente terapéutico regenerativo de la presente invención se puede usar también en combinación con un molde. Como agente terapéutico regenerativo de la presente invención, de manera específica, se pueden mencionar como adecuadas las preparaciones viscósas y agentes gelificantes. Más adelante en la presente memoria se describe cada caso con detalle.

Cuando el agente terapéutico regenerativo de la presente invención es una preparación viscosa (denominada también más adelante en la presente memoria como la preparación viscosa de la presente invención), la concentración de bFGF y/o un homólogo del mismo contenido en la preparación viscosa de la presente invención es del 0,05 al 0,5% en peso basado en el peso total de la preparación viscosa.

La preparación viscosa de la presente invención es preferiblemente una preparación que muestra una viscosidad de alrededor de 20 a 25.000 mPa·s, más preferiblemente, alrededor de 1.000 a 20.000 mPa·s, en particular preferiblemente alrededor de 3.000 a 15.000 mPa·s, tal como se determina a 25 °C mediante el uso de un viscosímetro de tipo E. La viscosidad está preferiblemente en este intervalo desde el punto de vista de la retención local tras la administración.

Se puede llevar a cabo un ajuste de la viscosidad normalmente mediante la adición de un espesante.

Como espesante, se puede usar cualquier material opcional con una concentración opcional con tal de que sea capaz de mostrar, por ejemplo, una viscosidad en el intervalo descrito anteriormente (alrededor de 20 a 25.000 mPa·s) cuando se prepara en forma de una disolución, no influye de manera adversa en la estabilidad de bFGF, y es farmacéuticamente aceptable. De manera específica, se puede usar hidroxipropil celulosa, alginato sódico, alginato de propilenglicol, polímero de carboxivinilo, carmelosa sódica, ácido hialurónico, hialuronato sódico, hidroxietil celulosa, hidroxietilmethyl celulosa, hidroxipropilmethyl celulosa, polí(ácido acrílico), poliacrilato sódico, producto parcialmente neutralizado de polí(ácido acrílico), poli(alcohol vinílico), metil celulosa, goma de xantano, condroitin-ácido, y condroitin-sulfato sódico, y similares. En particular, considerando el efecto sobre la estabilidad de bFGF, se puede usar preferiblemente hidroxipropil celulosa (HPC), hialuronato sódico, goma de xantano, y condroitin-sulfato sódico, y en particular, se puede usar preferiblemente hidroxipropil celulosa.

Además de estos espesantes, también se pueden usar espesantes tales como goma arábiga, goma arábiga en polvo, goma guar, glucono- δ -lactona, gelatina, dextrano 70, dextrina, tragacanto, tragacanto en polvo, povidona, jarabe de almidón, colofonia, polioxietilen (160) polioxipropilen (30) glicol, polioxietilen (200) polioxipropilen (70) glicol, y un copolímero de metil vinil éter y anhídrido maleico.

La preparación viscosa de la presente invención se puede preparar, por ejemplo, mediante un método descrito en el documento WO03/082321.

La hidroxipropilcelulosa (HPC) anteriormente mencionada es preferiblemente un derivado de éter hidroxipropílico de celulosa, y se prefieren las que contienen del 53,4 al 77,5% de un grupo hidroxipropilo cuando se determina en un material seco (*Farmacopea Japonesa*, Edición Decimocuarta D). Cuando se disuelve HPC en agua, se convierte en un líquido viscoso, y se puede usar cualquier HPC con un peso molecular elegido opcionalmente que muestre una viscosidad de alrededor de 20 a 25.000 mPa·s tal como se determina a 25 °C mediante el uso de un viscosímetro de tipo E cuando se prepara en forma de una disolución acuosa, a concentraciones que producen una viscosidad en el intervalo anteriormente descrito. Sin embargo, se puede usar preferiblemente una que tenga un peso molecular de alrededor de 100.000 a 500.000, que muestre una propiedad espesante elevada con una concentración baja, y es más preferible una que tenga un peso molecular de alrededor de 110.000 a 400.000. Por ejemplo, cuando se usa

una HPC con un peso molecular de alrededor de 110.000 a 150.000, se puede usar la HPC-M producida por Nippon Soda Co., Ltd. preferiblemente con una proporción de alrededor del 2 al 18% en peso, más preferiblemente alrededor del 3 al 10% en peso basado en la preparación viscosa total de la presente invención. Cuando se usa una HPC con un peso molecular de alrededor de 250.000 a 400.000, se puede usar la HPC-M producida por Nippon Soda Co., Ltd. preferiblemente con una proporción de alrededor del 1 al 9% en peso, más preferiblemente alrededor del 2 al 6% en peso basado en la preparación viscosa total de la presente invención. Con tal de que se pueda alcanzar una viscosidad en el intervalo anteriormente descrito, también se pueden usar HPCs con pesos moleculares diferentes en una mezcla según sea adecuado.

10 La preparación viscosa de la presente invención se puede preparar mezclando el espesante anteriormente descrito en bFGF y/o un homólogo del mismo, y disolviendo la mezcla en un disolvente para obtener una disolución que tiene una viscosidad predeterminada. La proporción de bFGF y/o un homólogo del mismo basada en la preparación viscosa total de la presente invención es del 0,0001 al 20% en peso, tal como se describió anteriormente; para obtener tal proporción, se mezcla bFGF y/o un homólogo del mismo. Como disolvente, se puede usar preferiblemente agua. La proporción del espesante a utilizar basada en la preparación viscosa total de la presente invención varía dependiendo del tipo de espesante usado, y se puede determinar en el intervalo que muestra una viscosidad de alrededor de 20 a 25.000 mPa·s (viscosímetro de tipo E) en disolución. Por ejemplo, cuando se usa una HPC que tiene un peso molecular de alrededor de 110.000 a 150.000 como espesante, el espesante se disuelve en un disolvente para obtener una proporción de alrededor del 2 al 18% en peso, preferiblemente una proporción de alrededor del 3 al 10% en peso. Cuando se usa una HPC que tiene un peso molecular de alrededor de 250.000 a 400.000, el espesante se disuelve en un disolvente para obtener una proporción de alrededor del 1 al 9% en peso, preferiblemente una proporción de alrededor del 2 al 6% en peso.

25 Si el agente terapéutico regenerativo de la presente invención es un agente gelificante (también denominado más adelante en la presente memoria agente gelificante de la presente invención), el agente gelificante de la presente invención contiene preferiblemente gelatina como vehículo.

30 Debido a que la gelatina anteriormente mencionada es un polímero natural que es degradable y absorbible en los organismos vivos, tiene una biocompatibilidad excelente, y es mínimamente irritante para los organismos vivos, también se prefiere como vehículo de liberación sostenida. La gelatina es en general hidrosoluble, y por lo tanto preferiblemente se insolubiliza. De manera específica, se puede usar preferiblemente un gel de gelatina reticulada insolubilizando en agua la gelatina mediante un tratamiento de reticulación.

35 La gelatina que sirve como material bruto para el gel de gelatina reticulada no está limitada en particular, y puede ser uno que esté disponible habitualmente. Los ejemplos de tal gelatina incluyen una gelatina tratada con álcalis que tiene un punto isoeléctrico de casi 5 (gelatina ácida), gelatina tratada con ácido que tiene un punto isoeléctrico de casi 9 (gelatina alcalina) y similares, y es preferible una gelatina ácida que tiene un punto isoeléctrico de casi 5 desde el punto de vista de la afinidad por bFGF. Aunque se puede usar un tipo de gelatina, se pueden usar diferentes tipos de diferentes materias primas y propiedades tales como solubilidad, peso molecular, y punto isoeléctrico en una mezcla según sea adecuado.

40 El agente de reticulación para la gelatina no está limitado en particular, con tal de que la toxicidad del mismo para los organismos vivos sea baja; por ejemplo, son preferibles glutaraldehído, carbodiimidas hidrosolubles tales como hidrocloruro de 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)carbodiimida y meto-p-toluenosulfonato de 1-ciclohexil-3-(2-morfolinoetil)carbodiimida, compuestos bisepoxi, formalina y similares; se prefieren en particular glutaraldehído e hidrocloruro de 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)carbodiimida.

45 La gelatina se puede reticular mediante tratamiento térmico o irradiación con luz ultravioleta o irradiación con un haz de electrones.

50 Cuando el vehículo es gelatina reticulada, el agente gelificante de la presente invención se puede preparar, por ejemplo, mediante un método descrito en el documento WO94/27630.

55 La forma del gel de gelatina reticulada usado en el agente gelificante de la presente invención no está limitada en particular; por ejemplo, puede ser columniforme, prismático, laminiforme, forma discoidal, forma esférica, forma particulada, forma granular, forma pastosa y similares. Cuando el gel de gelatina reticulada se usa en forma de una preparación inyectable, es preferible uno esférico, particulado, granular, o pastoso.

60 El gel de gelatina reticulada columniforme, prismático, laminiforme, o discoidal se puede preparar añadiendo una disolución acuosa de un agente de reticulación a una disolución acuosa de gelatina, o añadiendo gelatina a una disolución acuosa de un agente de reticulación, introduciendo la mezcla en un molde que tiene una forma deseada, y permitiendo la reacción de reticulación. Se puede usar un gel de gelatina moldeado tal como está, o se puede añadir una disolución acuosa de un agente de reticulación después de secarlo. Para parar la reacción de reticulación, el gel se puede poner en contacto con una sustancia de peso molecular bajo que tiene un grupo amino, tal como etanolamina o glicina, o se añade una disolución acuosa que tiene un pH de no más de 2,5. El gel de gelatina reticulada se lava con agua destilada, etanol, 2-propanol (denominado IPA más adelante en la presente memoria),

acetona y similares, y se somete a la formulación de un agente gelificante.

El contenido de agua del gel de gelatina reticulada obtenido es del 50 al 99% p/p. En la presente memoria, el contenido de agua del gel se refiere a la proporción del peso de agua en el gel, respecto del peso total del gel en estado húmedo.

El gel de gelatina reticulada pastoso se puede preparar mediante un método similar al método anteriormente descrito de preparación de un gel de gelatina reticulada columniforme, prismático, laminiforme, o discoidal.

Las condiciones de la reacción de reticulación se deben elegir según sea adecuado; la temperatura de la reacción es preferiblemente de 0 a 40 °C, y el tiempo de reacción es preferiblemente de 1 a 48 horas.

El gel de gelatina reticulada así obtenido también se puede secar a presión reducida o se puede liofilizar.

La liofilización se lleva a cabo, por ejemplo, colocando el gel de gelatina reticulada en agua destilada, y congelando el gel en nitrógeno líquido durante como mínimo 30 minutos o a -80 °C durante como mínimo 1 hora, y después secando el gel en un liofilizador durante 1 a 3 días.

Las concentraciones de gelatina y agente de reticulación para la preparación del gel de gelatina reticulada se deben elegir según el contenido de agua deseado según sea adecuado; se prefiere una concentración de gelatina del 1 al 100% p/v y una concentración de agente de reticulación del 0,01 al 100% p/v (equivalente a 1 a 5400 mM).

El gel de gelatina reticulada se puede producir para que tenga un contenido deseado de agua cambiando las concentraciones de gelatina (materias primas) y del agente de reticulación. Cuando se incrementa el contenido de agua, se puede reducir tanto la concentración de gelatina como la concentración del agente de reticulación; Cuando disminuye el contenido de agua, se puede incrementar tanto la concentración de gelatina como la concentración del agente de reticulación;

Para transportar el bFGF en el gel de gelatina reticulada así preparado, se añade una disolución acuosa de bFGF gota a gota al gel de gelatina reticulada para provocar la impregnación, o se suspende el gel de gelatina reticulada en una disolución acuosa de bFGF, para provocar el re-hinchamiento.

La cantidad de bFGF que se puede transportar en el gel de gelatina reticulada varía dependiendo del contenido de agua y similares, del gel de gelatina reticulada, y puede ser de 0,1 a 500 µg por 1 mg del gel de gelatina reticulada.

La duración de la liberación sostenida, la cantidad de bFGF liberado y similares varían dependiendo de una diversidad de condiciones, tales como el contenido de agua del gel de gelatina reticulada, las propiedades físicas de la gelatina usada, tales como el punto isoeléctrico y similares, la cantidad de bFGF transportada en la preparación, y el sitio de administración, y similares.

El agente gelificante de la presente invención así obtenido también se puede liofilizar. Para la liofilización, por ejemplo, el agente gelificante se congela en nitrógeno líquido durante como mínimo 30 minutos o a -80 °C durante como mínimo 1 hora, y después se seca en un liofilizador durante 1 a 3 días.

Cuando el agente gelificante de la presente invención se prepara en forma de una preparación inyectable, el agente gelificante se suspende en un medio tal como agua purificada para inyección, solución salina fisiológica, o una disolución tampón, según sea adecuado. La disolución tampón se exemplifica mediante disoluciones de tampón fosfato, disoluciones de tampón acetato, disoluciones de tampón citrato y similares. Cuando sea necesario, se pueden añadir agentes dispersantes, tensioactivos, agentes isotónicos, agentes de ajuste del pH, agentes calmantes, estabilizantes, conservantes, agentes colorantes y similares, que se usan en general para la producción de una preparación inyectable, según sea adecuado.

Debido a que el agente terapéutico regenerativo de la presente invención contiene un vehículo, se retiene de manera estable bFGF y/o un homólogo del mismo, lo que hace posible aplicar bFGF y/o un homólogo del mismo en un contenido bajo de manera constante y uniforme, y obtener una preparación que muestra una retención local excelente.

El agente terapéutico regenerativo de la presente invención tiene una acción de regeneración excelente sobre el complejo dentina-pulpa, y se puede usar de manera adecuada para el tratamiento de un diente con una pérdida de parénquima dental debida a caries dental, desgaste o lesión dental y similares, en particular un diente con caries dental grave que ha alcanzado la pulpa. El agente terapéutico regenerativo de la presente invención también es aplicable al tratamiento regenerativo del complejo dentina-pulpa, no solamente en seres humanos, sino también en otros mamíferos (por ejemplo, ratón, rata, hámster, conejo, gato, perro, ganado, oveja, mono y similares).

El complejo dentina-pulpa regenerado mediante el agente terapéutico regenerativo de la presente invención tiene una morfología más similar a la morfología fisiológica que una dentina-pulpa tratada con fármacos convencionales

- tales como preparaciones de hidróxido cálcico y similares. Es preferible que el complejo dentina-pulpa regenerado mediante el agente terapéutico regenerativo de la presente invención tenga una función más similar a la función fisiológica que una dentina-pulpa tratada con fármacos convencionales tales como preparaciones de hidróxido cálcico y similares.
- 5 "La morfología fisiológica" se refiere a la forma que posee el complejo dentina-pulpa intrínseco. De manera específica, el complejo dentina-pulpa regenerado mediante el agente terapéutico regenerativo de la presente invención es un complejo en el que la dentina está localizada en el lado de la cavidad de la caries dental, y la pulpa está localizada en el lado de la pulpa intrínseca, con prolongaciones de odontoblastos que se extienden hacia la dentina. "La función fisiológica" se refiere a la función que posee el complejo dentina-pulpa intrínseco. De manera específica, esta función es ser la base para el recubrimiento de esmalte para configurar un diente que resiste la fuerza oclusiva, y servir como órgano sensorial para la estimulación mecánica o estimulación química ejercida sobre un diente en la caries dental y el desgaste dental. En el complejo dentina-pulpa intrínseco, se sabe que los odontoblastos de la pulpa extienden sus prolongaciones hacia los túbulos dentinales, y desempeñan un papel como sensor para la estimulación externa; por lo tanto, el complejo dentina-pulpa que tiene dicha morfología, regenerado mediante el agente terapéutico regenerativo de la presente invención, también puede tener la función poseída por el complejo dentina-pulpa intrínseco. También se sabe que aunque la dentina se forma ligeramente mediante una preparación de hidróxido cálcico, su regeneración se limita a la dentina terciaria de la pulpa, y no se configura la morfología fisiológica del complejo dentina-pulpa.
- 10 20 La presente invención proporciona además un método de regeneración del complejo dentina-pulpa, que comprende una etapa de administración del agente terapéutico regenerativo de la presente invención a un sujeto que lo necesita. En la presente memoria, "un sujeto que lo necesita" es un sujeto que tiene un diente con una pérdida de parénquima dental debida a caries dental, desgaste o lesión dental y similares, en particular un diente con caries dental grave que ha alcanzado la pulpa. Los sujetos incluyen no solamente seres humanos, sino también otros mamíferos (por ejemplo, ratón, rata, hámster, conejo, gato, perro, ganado, oveja, mono y similares).
- 15 25 30 35 El agente terapéutico regenerativo de la presente invención se administra de manera tópica en la cara expuesta de la pulpa, o se prefiere el fondo del defecto de la dentina. Por ejemplo, se puede mencionar un método que comprende tomar una cantidad adecuada del agente terapéutico regenerativo de la presente invención mediante el uso de una jeringa equipada con una aguja de inyección de un grosor de alrededor de 0,8 mm a 0,5 mm, y administrar la misma en la cara expuesta de la pulpa o el fondo del defecto de la dentina, y similares. También es posible administrar el agente terapéutico regenerativo de la presente invención previamente relleno en el depósito de un producto de un equipo, como un dispositivo de inyección simple.
- 35 40 45 La dosis del agente terapéutico regenerativo de la presente invención se puede cambiar como sea adecuado según el sujeto, la gravedad, el peso corporal del sujeto y la edad, y similares, y en general es una cantidad que rellena la cara expuesta de la pulpa o el fondo del defecto de la dentina, en el caso de un ser humano. La frecuencia de administración varía dependiendo del caso y la dosis por tratamiento, y en general es de alrededor de 1 a 2 veces.
- 50 55 60 65 En la presente memoria, "recubrimiento de la pulpa" significa un recubrimiento directo de la pulpa y un recubrimiento indirecto de la pulpa. "Recubrimiento directo de la pulpa" se refiere a proteger una pulpa expuesta no infectada para estimular la capacidad de la pulpa de formar tejido duro, en un intento de cerrar la parte expuesta; "recubrimiento indirecto de la pulpa" se refiere a recubrir la dentina del fondo de la cavidad sana que se ha hecho más fina debido a una dentina ablandada o cavitación debida a una caries dental profunda y similares, para proteger la pulpa de la estimulación fisicoquímica y de infecciones, y para estimular la formación de la dentina reparada (dentina terciaria). El bFGF y/o un homólogo del mismo contenido en el agente de recubrimiento de la pulpa de la presente invención como ingrediente activo puede ser el mismo que el contenido en el agente terapéutico regenerativo de la presente invención. La concentración de bFGF y/o un homólogo del mismo contenido en el agente de recubrimiento de la pulpa de la presente invención es del 0,05 al 0,5% en peso basado en el peso total del agente de recubrimiento de la pulpa. El agente de recubrimiento de la pulpa de la presente invención tiene una acción excelente de regeneración del complejo dentina-pulpa con una morfología y función más fisiológicas, en comparación con las preparaciones de hidróxido cálcico usadas de manera convencional, y se puede usar de manera adecuada como agente de recubrimiento de la pulpa para proteger la pulpa de un diente con una pérdida de parénquima dental debida a caries

dental, desgaste o lesión dental y similares en el complejo dentina-pulpa.

El método de recubrimiento de la pulpa directamente o indirectamente comprende una etapa de administración del agente de recubrimiento de la pulpa de la presente invención a un sujeto que lo necesita. El sujeto, el método de administración y similares son iguales a los del agente terapéutico regenerativo de la presente invención.

La dosis del agente de recubrimiento de la pulpa de la presente invención se puede cambiar como sea adecuado según el sujeto, la gravedad, el peso corporal del sujeto y la edad, y similares, y en general es una cantidad que rellena la cara expuesta de la pulpa o el fondo del defecto de la dentina, en el caso de un ser humano. La frecuencia de administración varía dependiendo del caso y la dosis por tratamiento, y normalmente es de alrededor de 1 a 2 veces.

Ejemplos

La presente invención se describe más adelante en la presente memoria con detalle por medio de los siguientes Ejemplos, que no se deben considerar limitantes.

Ejemplo 1

(Métodos)

Se suministró para los experimentos una preparación que comprendía hidroxipropilcelulosa HPC; (producida por Nippon Soda Co., Ltd.) como base y un 0,089% en peso de bFGF (producido por Kaken Pharmaceutical Co., Ltd.) o una preparación que comprendía un gel de gelatina reticulada como base y un 0,4% en peso de bFGF (producido por Kaken Pharmaceutical Co., Ltd.), y una preparación que comprendía gel de gelatina reticulada como base y Dycal (preparación de Ca(OH)₂ producida por Calk). Estas preparaciones se produjeron mediante los métodos descritos en los documentos WO03/082321 y WO94/27630.

Para la experimentación con animales se usaron perros beagle hembra de 1 año de edad. Bajo anestesia intravenosa con Ketalar y Nembutal, se formó una cavidad en la cara labial de cada diente canino en las mandíbulas superior e inferior mediante el uso de una broca de diamante, y el diente se taladró mediante el uso de una broca redonda de 1/2 para exponer la pulpa. El sitio de operación se lavó con solución salina fisiológica, y se llevó a cabo la hemostasia y el secado, tras lo cual se añadió cada preparación a la cara expuesta de la pulpa, y la cavidad se llenó con una resina fotopolimerizable después de un tratamiento con adhesivo iniciador. Como control negativo, un diente no se trató o se trató con la base sola. Tras el tratamiento, los animales se alimentaron con un alimento normal; 1 mes más tarde, se extrajeron los dientes. Los dientes extraídos se fijaron con una disolución tamponada de paraformaldehído del 4%, y se descalcificaron con líquido de descalcificación de formiato/citrato sódico, tras lo cual se prepararon cortes histológicos mediante un método convencional y se tiñeron con HE, y se determinó histopatológicamente el efecto de bFGF sobre la regeneración del complejo dentina-pulpa.

(Resultados)

Mediante el uso de una preparación que comprendió gel de gelatina reticulada como base, se determinó el efecto de bFGF sobre la dentinogénesis (FIG. 1). La determinación se llevó a cabo en cinco grados con la dentinogénesis terciaria como índice (-: No se formó dentina terciaria, ±: casi no se formó dentina terciaria, +: se formó una pequeña cantidad de dentina terciaria, 2+: se formó una cantidad moderada de dentina terciaria, 3+: se formó notablemente dentina terciaria). Sin tratamiento, se observó una dentinogénesis terciaria en un 45%, pero el grado de formación fue de alrededor de + en la mayoría de los casos. Con el tratamiento con Dycal, se observó una dentinogénesis terciaria solamente en un 21,4%. Sin embargo, con el tratamiento con bFGF, la neogénesis de dentina se dio en un 50%, con una puntuación 2+ o 3+ para todos los casos; se observó una dentinogénesis notable. En resumen, el tratamiento con bFGF tuvo tendencia a producir una formación claramente observable de dentina terciaria. Cuando se usó HPC como base, se obtuvieron resultados similares (datos no mostrados).

Con la preparación que comprendió gel de gelatina reticulada como base, se examinó la regeneración del complejo dentina-pulpa mediante el uso de un microscopio óptico (X20) (FIG. 2). Sin tratamiento, no se formó tejido duro, y se observó vasodilatación en el tejido pulpar (FIG. 2(A)). Con el tratamiento con la utilización del gel de gelatina reticulada solo, se observó solamente una ligera formación de tejido duro y signos de vasodilatación (FIG. 2(B)). Con el tratamiento con bFGF, se observó la formación de tejido duro que cubrió el defecto y una neogénesis notable de vasos sanguíneos. También se observó una formación notable de tejido duro de dentina, y la formación masiva de tejido conectivo, parcialmente con formación de tejido duro, que implicó partes profundas de la dentina defectuosa (FIG. 2(C)). Se observó una disposición de células similares a odontoblastos en contacto con la dentina recién formada prácticamente idéntica a los hallazgos normales; se sugirió la regeneración del complejo dentina-pulpa fisiológico. Con el tratamiento con Dycal, se formó una pequeña cantidad de tejido duro, pero se observó una vasodilatación e infiltración celular notable en el tejido pulpar de cara al defecto, lo que mostró un perfil de inflamación grave (FIG. 2(D)). Cuando se usó HPC como base, se obtuvieron resultados similares (datos no mostrados).

Con la preparación que comprendió gel de gelatina reticulada como base, se examinó la regeneración del complejo dentina-pulpa mediante el uso de un microscopio óptico de gran aumento (FIG. 3). Con el tratamiento con bFGF, la formación de tejido duro fue notable (FIG. 3(A) (X40)), y se observó una diferenciación hasta la dentina (FIG. 3(B) (X200)). Con el tratamiento con Dycal, la cantidad de tejido duro formado fue pequeña (FIG. 3(C) (X200)). Cuando se usó HPC como base, se obtuvieron resultados similares (datos no mostrados).

5 **Ejemplo 2**

10 (Métodos)

15 Una preparación que comprendió hidroxipropilcelulosa (HPC; producida por Nippon Soda Co., Ltd.) como base y un 0,089% en peso de bFGF (producido por Kaken Pharmaceutical Co., Ltd.) se sometió a los experimentos. Los experimentos con animales se llevaron a cabo de la misma manera que en el Ejemplo 1, en los que no se expuso la pulpa al formar un defecto de la dentina, y cada preparación se añadió al fondo del defecto de la dentina. Se examinó el efecto regenerativo de bFGF sobre el complejo dentina-pulpa sin exposición de la pulpa.

20 (Resultados)

25 Como en el Ejemplo 1, incluso sin la exposición de la pulpa, el tratamiento con bFGF produjo una neogénesis de dentina que conservó la morfología del complejo dentina-pulpa (dentina terciaria) (FIG. 4).

Aplicabilidad industrial

30 El agente terapéutico regenerativo de la presente invención es eficaz en la inducción de la proliferación de las células de la pulpa, la regeneración del tejido pulpar, la proliferación de odontoblastos y la inducción de la diferenciación, y la regeneración de la dentina (dentina terciaria). En el tratamiento de un diente con caries dental grave, para lo cual convencionalmente no ha habido expectativas de curación regenerativa, la aplicación del agente terapéutico regenerativo de la presente invención hace posible regenerar el complejo dentina-pulpa, lo que da como resultado la expectativa de un tratamiento ideal de un diente con caries dental que restablece la función y la percepción masticatoria. El complejo dentina-pulpa regenerado mediante el agente terapéutico regenerativo de la presente invención es capaz de mantener la fuerza del diente, la resistencia a la caries dental, la calidad estética, la adherencia y similares. Como resultado, el método que emplea este agente terapéutico prolonga enormemente la vida de los dientes permanentes.

35 Debido a que el agente terapéutico regenerativo de la presente invención es capaz de regenerar un complejo dentina-pulpa que tiene la morfología y/o función fisiológica, puede servir como agente terapéutico para la caries dental que restablece la función y percepción masticatoria. Debido a que el agente de recubrimiento de la pulpa de la presente invención también es capaz de regenerar un complejo dentina-pulpa que tiene una morfología y/o función prácticamente fisiológica, se puede usar de manera adecuada como agente de recubrimiento de la pulpa para proteger la pulpa de un diente con una pérdida de parénquima dental debida a caries dental, desgaste o lesión dental y similares.

40 Esta solicitud se basa en una solicitud de patente N° 2005-305076 presentada en Japón (fecha de presentación: 19 de octubre de 2005).

REIVINDICACIONES

- 5 1. Un agente terapéutico para el uso en un método de regeneración de un complejo dentina-pulpa con la morfología fisiológica, en el que la dentina se localiza en el lado de la cavidad de la caries dental, y la pulpa se localiza en el lado de la pulpa intrínseca, y las prolongaciones de los odontoblastos se extienden hacia la dentina, que comprende del 0,05 al 0,5% en peso de factor de crecimiento de fibroblastos básico y/o un homólogo del mismo como ingrediente activo, e hidroxipropilcelulosa o gel de gelatina reticulada como vehículo,
- 10 en el que el homólogo es
- 10 [II] un polipéptido que consiste en una secuencia de aminoácidos que tiene 1 a 6 aminoácidos sustituidos por tipo(s) diferente(s) de aminoácidos, y que tiene la actividad biológica del factor de crecimiento de fibroblastos básico; o
- 15 [III] un polipéptido en el que se añade un segmento de aminoácidos adicional que consiste en 1 a 12 aminoácidos y que no reduce la actividad biológica del factor de crecimiento de fibroblastos básico o el polipéptido de [I] en el extremo N-terminal y/o C-terminal del factor de crecimiento de fibroblastos básico o el polipéptido de [I], y
- 20 que se va a administrar de manera tópica en la cara expuesta de la pulpa o el fondo del defecto de la dentina.
- 20 2. El agente terapéutico para el uso en un método de regeneración de un complejo dentina-pulpa con la morfología fisiológica de la reivindicación 1, en el que el factor de crecimiento de fibroblastos básico es el factor de crecimiento de fibroblastos básico humano.
- 25 3. El agente terapéutico para el uso en un método de regeneración de un complejo dentina-pulpa con la morfología fisiológica de la reivindicación 1 ó 2 en el tratamiento de un diente con una pérdida de parénquima dental debida a una caries dental, desgaste o lesión dental.
- 30 4. El agente terapéutico para el uso en un método de regeneración de un complejo dentina-pulpa con la morfología fisiológica de la reivindicación 3, en el que la caries dental ha alcanzado la pulpa.
- 30 5. El agente terapéutico para el uso en un método de regeneración de un complejo dentina-pulpa con la morfología fisiológica de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, que es un agente de recubrimiento de la pulpa.

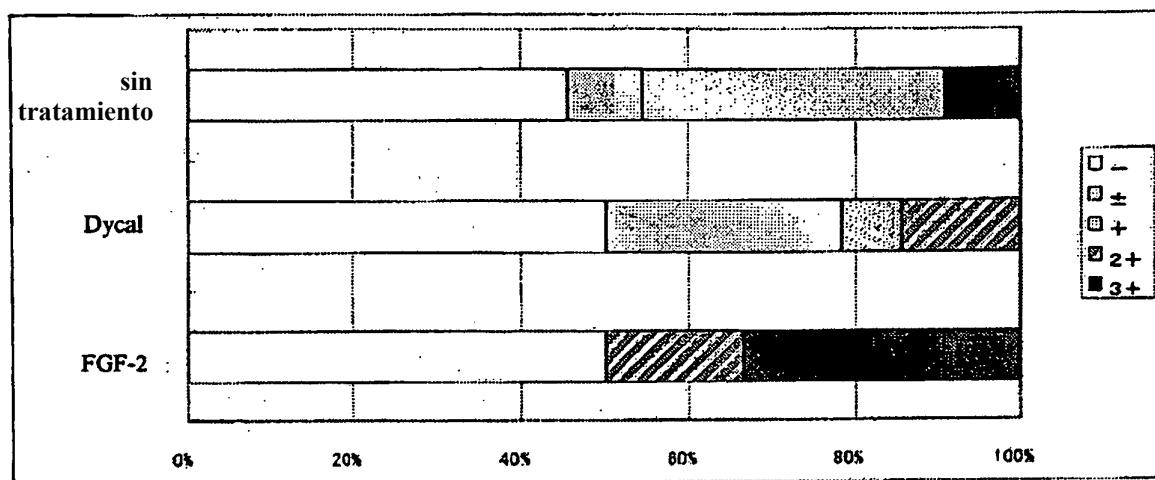
FIG. 1

FIG. 2

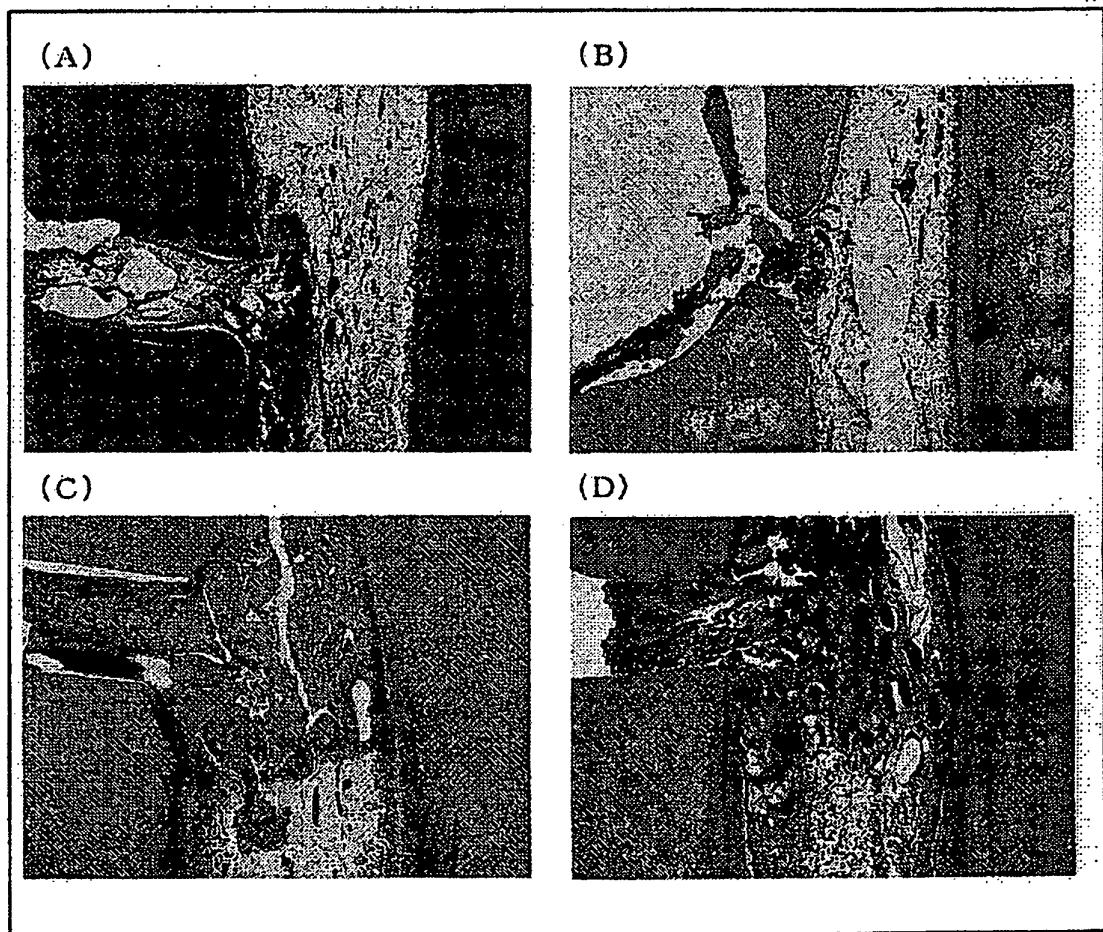


FIG. 3

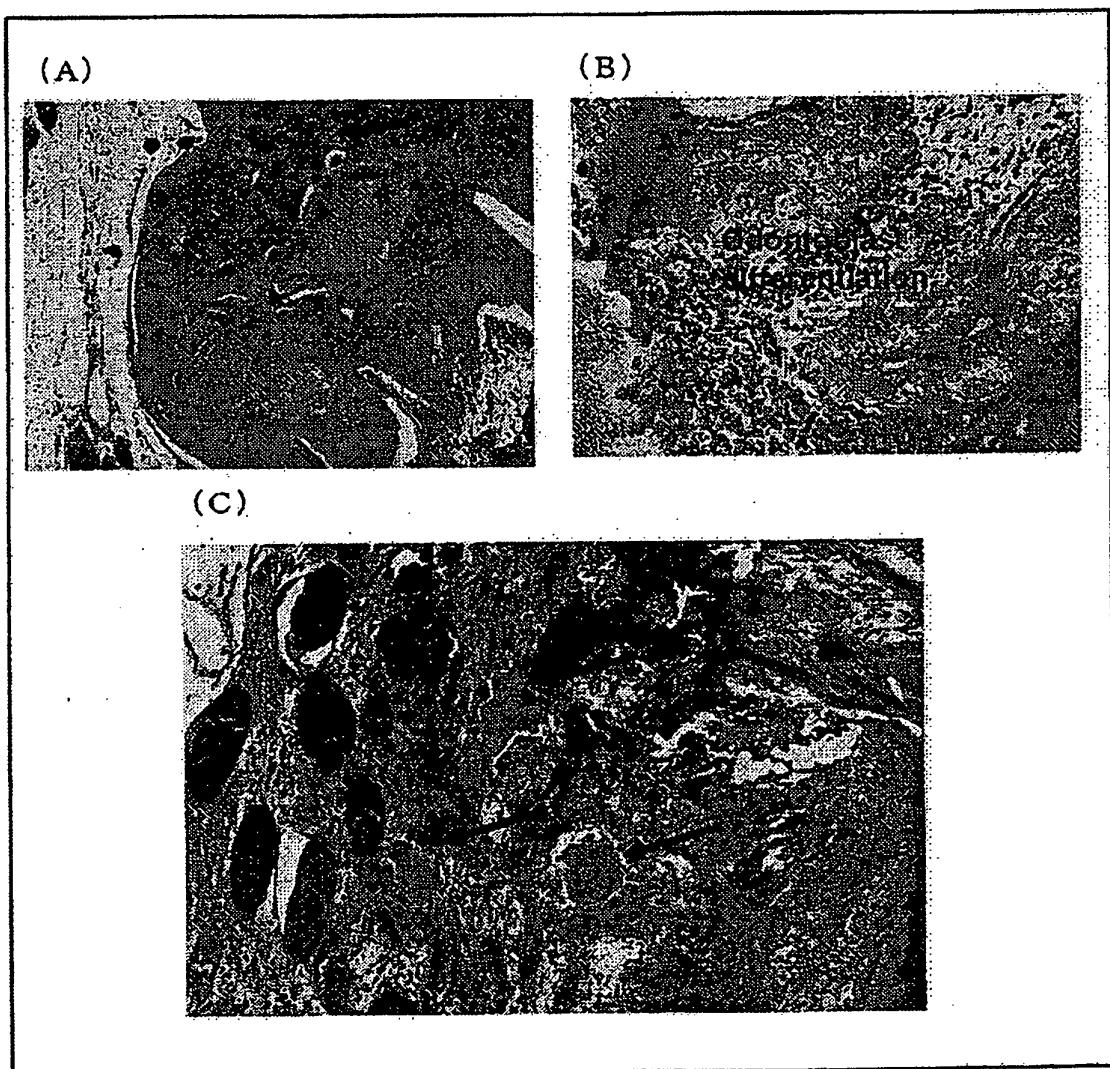


FIG. 4

