

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 492 015**

21 Número de solicitud: 201330135

51 Int. Cl.:

A61K 47/40 (2006.01)

12

SOLICITUD DE PATENTE

A1

22 Fecha de presentación:

05.02.2013

43 Fecha de publicación de la solicitud:

08.09.2014

56 Se remite a la solicitud internacional:

PCT/ES2014/070070

71 Solicitantes:

**UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE
COMPOSTELA (100.0%)
Edificio EMPRENDIA - Campus Vida
15782 Santiago de Compostela (A Coruña) ES**

72 Inventor/es:

**ALVAREZ LORENZO, Carmen;
CONCHEIRO NINE, Angel y
SIMOES, Susana**

74 Agente/Representante:

TORRENTE VILASÁNCHEZ, Susana

54 Título: **HIDROGELES DE POLOXAMINA Y SU USO PARA LA REGENERACIÓN O REPARACIÓN ÓSEA**

57 Resumen:

Hidrogeles de poloxamina y su uso para la regeneración o reparación ósea.

La presente invención se relaciona con hidrogeles de poloxamina y ciclodextrina que pueden incorporar una estatina. La incorporación de ciclodextrinas permite disminuir la concentración de poloxamina necesaria para dar lugar a la formación de geles y aumenta además la actividad osteogénica/osteoinductiva de la poloxamina. Dichos hidrogeles promueven la diferenciación de células madre mesenquimales a osteoblastos y pueden utilizarse para la reparación, regeneración o aumento de la formación de hueso.

ES 2 492 015 A1

DESCRIPCIÓN

HIDROGELES DE POLOXAMINA Y SU USO PARA LA REGENERACIÓN O REPARACIÓN ÓSEA

CAMPO DE LA INVENCION

5 La presente invención se relaciona con hidrogeles de poloxamina y ciclodextrina que pueden incorporar una estatina. Dichos hidrogeles promueven la diferenciación de células madre mesenquimales a osteoblastos y pueden utilizarse para la reparación, regeneración o aumento de la formación de hueso.

ANTECEDENTES DE LA INVENCION

10 La prevalencia de enfermedades osteodegenerativas así como de fracturas accidentales, principalmente debido a la esperanza de vida más prolongada y la popularización de las prácticas deportivas, promueve la búsqueda de alternativas a los injertos autólogos y de donante así como a los soportes precargados con costosas
15 proteínas morfogénicas recombinantes. En la actualidad, las proteínas morfogénicas óseas (BMPs), principalmente rhBMP-2 y/o rhBMP-7, se utilizan en clínica incorporadas a esponjas de colágeno para fracturas abiertas de tibia que no cierran y fusiones espinales. También se encuentran en fase de estudio los portadores que pueden ser aplicados en el defecto crítico empleando técnicas mínimamente invasivas, y que
20 además ofrecen estabilización y lenta eliminación de las BMPs del lugar de aplicación. Sin embargo, la rápida metabolización local y el alto coste de las proteínas recombinantes obliga a buscar moléculas sintéticas osteogénicas/osteoinductivas que sean más asequibles y estables y que mimeticen los estímulos bioquímicos que las células madre mesenquimales (MSCs) reciben en su nicho óseo nativo para
25 diferenciarse a precursores de hueso.

 Las estatinas son potentes profármacos de inhibidores de la 3-hidroxi-3-metilglutaril-coenzima A (HMG-CoA) reductasa, que actúan bloqueando la conversión de HMG-CoA mevalonato, metabolito clave en la biosíntesis de colesterol. Varios estudios han puesto de manifiesto que las estatinas, en particular la simvastatina, promueven la
30 osteogénesis en líneas celulares murinas y humanas. Comparativamente con otros agentes sintéticos osteoinductivos, las estatinas tienen la ventaja adicional de promover la formación de nuevos vasos sanguíneos (angiogénesis) y de actuar como anti-inflamatorios. Se ha demostrado que las estatinas inducen la expresión de BMP-2 y estimulan la formación de hueso de la bóveda craneal (calvaria) de ratones tras la
35 administración diaria de inyecciones subcutáneas (G. Mundy, Science 1999, 286, 1946). Las dosis requeridas para dar lugar a efectos osteoinductivos son mayores que las

requeridas como hipolipemiantes, lo que podría provocar efectos secundarios graves si se administrase por vía sistémica. La administración oral también se ve limitada por la baja solubilidad de la simvastatina y la tendencia a que se abra el grupo lactona resultando en la forma hidroxilada, que difícilmente atraviesa la pared del intestino.

5 En la solicitud de patente WO2011/144785 se describe el uso de copolímeros de bloque de poli(óxido de etileno)-poli(óxido de propileno) (PEO-PPO) de la familia de las poloxaminas (Tetronic®) para la diferenciación de MSCs en osteoblastos. La actividad osteoinductiva intrínseca de las poloxaminas ofrece nuevas perspectivas en el abordaje de la regeneración de hueso al permitir utilizar procedimientos mínimamente invasivos; es decir, la preparación de sistemas acuosos de baja viscosidad que pueden ser fácilmente administrados utilizando una jeringuilla y que experimentan una transición de solución a gel a 37 °C, convirtiéndose en soportes viscoelásticos osteoinductivos. No obstante, la obtención de geles capaces de permanecer en el sitio de inyección (el defecto crítico en nuestro caso) y sostener la liberación del agente terapéutico incorporado requiere una alta concentración del copolímero de bloque. Por ello, sería deseable encontrar sistemas que permitan reducir la concentración del copolímero para reducir así posibles problemas de toxicidad sin detrimento de su efectividad.

RESUMEN DE LA INVENCIÓN

20 Los inventores han encontrado que la combinación de estatinas y poloxaminas producen un efecto osteogénico y/o osteoinductivo sinérgico. Y además que la incorporación de ciclodextrinas promueve complejos de inclusión con las poloxaminas dando lugar a la formación de hidrogeles que permiten disminuir la concentración de las poloxaminas y que además permiten una liberación controlada de estatinas.

25 Por tanto, en un primer aspecto, la invención se dirige a un hidrogel que comprende al menos una poloxamina, al menos una ciclodextrina y al menos una estatina.

En otro aspecto, la invención se refiere al uso del hidrogel de la invención como vehículo para la administración de una molécula biológicamente activa adicional.

30 Otro aspecto se refiere al uso del hidrogel de la invención en la preparación de un medicamento.

Otro aspecto de la invención se refiere al uso del hidrogel de la invención para la preparación de un medicamento para inducir o aumentar la diferenciación de células mesenquimales a osteoblastos, preferiblemente para la reparación, regeneración o aumento de la formación de hueso.

35 En otro aspecto, la invención se dirige a una composición farmacéutica que

comprende el hidrogel de la invención y un excipiente farmacéuticamente aceptable.

Otro aspecto se refiere a un implante que comprende el hidrogel o la composición farmacéutica de la invención.

En otro aspecto, la invención se dirige a un método *in vitro* para inducir la
5 diferenciación de células mesenquimales, excepto células madre embrionarias humanas, en osteoblastos que comprende poner en contacto (a) el hidrogel de la invención, con (b) células mesenquimales, excepto células madre embrionarias humanas, que se encuentran en un medio de cultivo.

Otros aspectos adicionales se refieren al hidrogel de la invención para su uso
10 como medicamento y para inducir o aumentar la diferenciación de células mesenquimales a osteoblastos, preferiblemente para su uso en la reparación, regeneración o aumento de la formación de hueso.







En otro aspecto, la invención se refiere a un método para inducir o aumentar la
15 diferenciación de células mesenquimales a osteoblastos, preferiblemente para la reparación, regeneración o aumento de la formación de hueso en un paciente, que comprende la administración del hidrogel de la invención.

RESUMEN DE LAS FIGURAS

Figura 1. Módulos de almacenamiento (símbolos llenos – G') y de pérdida (símbolos vacíos – G'') de las formulaciones de T908- α CD preparadas con 1% (cuadrados), 2%
20 (triángulos hacia arriba), 3% (círculos), 4% (triángulos hacia abajo), 5% (diamantes), 8% (triángulos hacia la izquierda), 13% (estrellas) y 20% (triángulos hacia la derecha) de T908, sin α CD o con 5% y 9,7% α CD a 37°C.

Figura 2. Viabilidad de osteoblastos en contacto con geles supramoleculares de T908-
25 α CD.

Figura 3. Cesión de simvastatina a 37 °C a partir de formulaciones de Tetronic 908 al 4% (cuadrados) y al 8% (círculos), sin α CD (símbolos vacíos y línea continua), con 5% α CD (símbolos con relleno negro y línea continua) y con 9,7% α CD (símbolos con relleno negro y línea discontinua). 100% cedido correspondería a 0,064 mg/cm².

Figura 4. Evolución temporal de la proliferación de las células madre mesenquimales (determinada utilizando el ensayo MTT) en medio de cultivo (control negativo), medio osteogénico (control positivo) y medio de cultivo al que se incorporó disolución de simvastatina al 0,08, 0,85, 8,5 y 42,5 μ M, que se representan en la figura con los siguientes símbolos:  control negativo;  control positivo;  0,08 μ M de simvastatina;  0,85 μ M de simvastatina;  8,5 μ M de simvastatina;  42,5
35 simvastatina;

μM de simvastatina. Las concentraciones finales de fármaco en el medio de cultivo fueron 0,01, 0,1, 1 y 5 μM , respectivamente.







Figura 5. Actividad ALP de células madre mesenquimales en medio de cultivo (control negativo), medio osteogénico (control positivo) y en medio de cultivo al que se incorporó disolución de simvastatina al 0,08, 0,85, 8,5 y 42,5 μM , que se representan en la figura con los siguientes símbolos:  control negativo;  control positivo;  0,08 μM de simvastatina;  0,85 μM de simvastatina;  8,5 μM de simvastatina;  42,5 μM de simvastatina. Las concentraciones finales de fármaco en el medio de cultivo fueron 0,01, 0,1, 1 y 5 μM , respectivamente.















Figura 6. Evolución temporal de la proliferación de las células madre mesenquimales (determinada utilizando el ensayo MTT) en medio de cultivo (control negativo), medio osteogénico (control positivo) y medio de cultivo al que se incorporaron las formulaciones de T908 sin y con αCD y simvastatina, que se representan en la figura con los siguientes símbolos:  control negativo;  control positivo;  4% T908;  4% T908+ 0,08 μM de simvastatina;  4% T908 + 8,5 μM de simvastatina;  4% T908 + 5% αCD ;  4% T908 + 5% αCD + 0,08 μM de simvastatina;  4% T908 + 5% αCD + 8,5 μM de simvastatina;  8% T908;  8% T908 + 0,08 μM de simvastatina;  8% T908 + 8,5 μM de simvastatina;  8% T908 + 5% αCD ;  8% T908 + 5% αCD + 0,08 μM de simvastatina;  8% T908+ 5% αCD + 8,5 μM de simvastatina. Las concentraciones finales de fármaco en el medio de cultivo son las indicadas en la Tabla 3.















Figura 7. Actividad ALP de células madre mesenquimales en medio de cultivo (control negativo), medio osteogénico (control positivo) y en medio de cultivo al que se incorporaron las formulaciones de T908 sin y con αCD y simvastatina, que se representan en la figura con los siguientes símbolos:  control negativo;  control positivo;  4% T908;  4% T908+ 0,08 μM de simvastatina;  4% T908 + 8,5 μM de simvastatina;  4% T908 + 5% αCD ;  4% T908 + 5% αCD + 0,08 μM de simvastatina;  4% T908 + 5% αCD + 8,5 μM de simvastatina;  8% T908;  8% T908 + 0,08 μM de simvastatina;  8% T908 + 8,5 μM de simvastatina;  8% T908 + 5% αCD ;  8% T908 + 5% αCD + 0,08 μM de simvastatina;  8% T908+ 5% αCD + 8,5 μM de simvastatina. Las concentraciones finales de fármaco en el medio de cultivo son las indicadas en la Tabla 3.

Figura 8. Tinción de ALP de células transcurridos 12 días en medio control negativo (A),

medio osteogénico (B), medio con 0,08 ó 8,5 μ M simvastatina en PBS (C,D), 4 % T908 con 0, 0,08 ó 8,5 μ M simvastatina (E, F, G), 4 % T908 – 5 % α CD con 0, 0,08 ó 8,5 μ M simvastatina (H, I, J), 8 % T908 con 0, 0,08 ó 8,5 μ M simvastatina (K, M, N) y 8 % T908 – 5 % α CD con 0, 0,08 ó 8,5 μ M simvastatina (O, P, Q).

5

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

Los inventores han observado que los sistemas que incorporan poloxamina, ciclodextrina y estatina muestran una actividad fosfatasa alcalina (ALP) muy superior que los sistemas que presentan poloxamina sola (Figura 7) o una estatina sola (Figura 5). La combinación estatina y poloxamina produce un efecto sinérgico que conduce a un aumento significativo de la actividad osteogénica/osteoinductiva (Figura 8). Además, los hidrogeles de la invención proporcionaron una liberación sostenida de estatina, lo que resulta en una actividad fosfatasa alcalina (ALP) más intensa y prolongada en el tiempo (Figuras 3 y 7).

Además, la adición de ciclodextrinas permite disminuir la concentración de poloxamina necesaria para dar lugar a la formación de geles. De hecho se ha observado que la adición de ciclodextrinas a poloxaminas permite la formación de geles a bajas concentraciones de la poloxamina incluso a temperatura ambiente (Tabla 1). La poloxamina y la ciclodextrina se encuentran formando un complejo de inclusión. De esta forma, la utilización de pequeñas cantidades de poloxamina y de ciclodextrina permite la preparación de hidrogeles que presentan una buena compatibilidad tanto con células mesenquimales como con osteoblastos. Además, la ciclodextrina favoreció una diferenciación más temprana y prolongada de células mesenquimales a osteoblastos.

Los hidrogeles de la invención pueden esterilizarse mediante calor húmedo (autoclave) sin afectar a sus propiedades reológicas.

En un primer aspecto, la invención se relaciona con un hidrogel que comprende al menos una poloxamina, al menos una ciclodextrina y al menos una estatina.

El término “hidrogel” hace referencia a una red polimérica tridimensional que contiene agua.

En la presente invención, se entiende por “poloxaminas” un copolímero de bloques de poli(óxido de etileno) (PEO) y poli(óxido de propileno) (PPO) que presentan una estructura en estrella con cuatro brazos de PEO-PPO que terminan en grupos hidroxilo y donde los cuatro brazos están unidos a través de un grupo etilendiamino central. Las poloxaminas se encuentran disponibles comercialmente en una amplia variedad de pesos moleculares y de relaciones molares EO/PO (comercializadas por BASF).

alguno(s) de los grupos hidroxilo está(n) sustituido(s) como, por ejemplo, hidroxipropilciclodextrinas, carboximetilciclodextrinas, sulfobutilciclodextrinas, aminociclodextrinas, dimetilciclodextrinas, ciclodextrinas fosfato, hidroxietilciclodextrinas, acetilciclodextrinas, etilciclodextrinas, trimetilciclodextrinas, carboxietilciclodextrinas, glucosilciclodextrinas, butilciclodextrinas, ciclodextrinas sulfatadas o sulfopropilciclodextrinas.

En una realización particular, la ciclodextrina es α -ciclodextrina o un derivado de la misma. Preferiblemente, la ciclodextrina es α -ciclodextrina.

Las estatinas son compuestos inhibidores de la 3-hidroxi-3-metilglutaril coenzima A (HMG-CoA) reductasa. Ejemplos de estatinas que pueden emplearse en la presente invención incluyen simvastatina, atorvastatina, pravastatina, cerivastatina, mevastatina, velostatina, fluvastatina, lovastatina, rosuvastatina y fluindostatina. Preferiblemente, la estina es simvastatina.

La simvastatina es un compuesto policíclico con estructura y solubilidad dependientes del pH y que presenta una baja solubilidad en agua. En función del pH, la forma predominante de simvastatina es la lactona o la forma hidroxilácida. Se ha observado (Tabla 2) que los hidrogeles de la invención permiten solubilizar simvastatina y además estabilizan la forma hidroxilácida (que es la forma a la que se le ha atribuido la actividad osteogénica). La incorporación de simvastatina no alteró el proceso de gelificación ni afectó a las propiedades reológicas de los geles.

En una realización, la concentración de ciclodextrina en el hidrogel es de entre el 1 y el 20% p/v, entre el 2 y el 15% p/v, entre el 2 y el 10% p/v o entre el 3 y el 8% p/v. En una realización preferida, la concentración de ciclodextrina en el hidrogel es de entre el 4 y el 6% p/v, más preferiblemente del 5% p/v.

En una realización particular, la concentración de poloxamina en el hidrogel es de entre el 1 y el 20% p/v, o entre el 3 y el 9% p/v. En una realización particular, la concentración de poloxamina en el hidrogel es de entre el 1 y el 20% p/v, o entre el 3 y el 9% p/v y la concentración de ciclodextrina es de entre el 3 y el 8% p/v. En una realización particular, la concentración de poloxamina en el hidrogel es de entre el 4 y el 8% p/v y la concentración de ciclodextrina es de entre el 4 y el 6% p/v.

En una realización particular, la poloxamina tiene un valor medio de a entre 112 y 116, un valor medio de b entre 18 y 22 y un peso molecular promedio entre 20000 y 30000 Da, y la ciclodextrina es α -ciclodextrina.

En una realización particular, la poloxamina tiene un valor medio de a entre 112 y 116, un valor medio de b entre 18 y 22 y un peso molecular promedio entre 20000 y 30000 Da, y se encuentra en una concentración entre el 3 y el 9% p/v, preferiblemente

entre el 4 y el 8% p/v, y la ciclodextrina es α -ciclodextrina y se encuentra en una concentración entre el 3 y el 8% p/v, preferiblemente entre el 4 y el 6% p/v.

En una realización particular, la concentración de estatina en el hidrogel es de entre 0.001 y 15% p/v.

5 En una realización particular, el hidrogel de la invención comprende además una molécula biológicamente activa.

El término “molécula biológicamente activa” o “ingrediente activo” se refiere a cualquier sustancia que se emplee en el tratamiento, cura, prevención o diagnóstico de una enfermedad o que es empleada para mejorar el bienestar físico o mental. En una
10 realización particular, la molécula activa es una proteína morfogénica, como por ejemplo, BMP-2, BMP-4, BMP-5, BMP-6, BMP-7 o BMP-8b, o una combinación de ellas.

En otro aspecto, la invención se refiere a un procedimiento para la preparación de un hidrogel de la invención que comprende mezclar una disolución acuosa de poloxamina a pH entre 6,0 y 9,0, preferiblemente 7,4, una disolución acuosa de
15 ciclodextrina a pH entre 6,0 y 9,0, preferiblemente 7,4 y una estatina. La estatina se incorpora a la disolución de poloxamina, o a la disolución de ciclodextrina o a un hidrogel intermedio previamente formado por la poloxamina y la ciclodextrina.

En otro aspecto, la invención se dirige a un hidrogel obtenible por el procedimiento anterior.

20 En otro aspecto la invención se refiere a una composición farmacéutica que comprende el hidrogel de la invención y un excipiente farmacéuticamente aceptable.

El término “excipiente” se refiere a cualquier sustancia de la composición farmacéutica distinta del ingrediente activo. Dichos excipientes pueden ser líquidos estériles, como por ejemplo agua y aceites, incluyendo aquéllos de origen del petróleo,
25 animal, vegetal o sintético, tales como aceite de cacahuete, aceite de soja, aceite mineral, aceite de sésamo y similares, disgregantes, agentes humectantes, agentes solubilizantes, antioxidantes, conservantes, antimicrobianos, agentes de tonicidad, agentes estabilizantes o de suspensión, o diluyentes.

El término “farmacéuticamente aceptable” se refiere a entidades que son tolerable
30 fisiológicamente y no producen normalmente reacciones alérgicas o reacciones no favorables como trastornos gástricos, mareos y reacciones similares, cuando son administradas en humanos o animales. La expresión “farmacéuticamente aceptable” significa que está aprobado por una agencia reguladora de un gobierno de estado o federal o está incluido en la Farmacopea Estadounidense u otra farmacopea reconocida
35 de modo general para su uso en animales, y de manera más particular en seres humanos.

Las formulaciones se pueden preparar según métodos convencionales tales como los que se describen en las Farmacopeas Española, Europea o de Estados Unidos de América, o en textos de referencia similares, por ejemplo "Tecnología Farmacéutica", de J.L. Vila Jato, 1997, Editorial Síntesis.

5 Los hidrogeles y las composiciones farmacéuticas de la invención se pueden administrar por vía enteral, tópica o parenteral. Preferiblemente, son para administración parenteral. Por ejemplo, los hidrogeles y las composiciones farmacéuticas de la invención se pueden administrar mediante inyección, por ejemplo, inyección intramuscular, subcutánea, intraósea o intratecal, o mediante aplicación en una cavidad
10 abierta durante la cirugía. Preferiblemente, los hidrogeles y las composiciones farmacéuticas de la invención se administran mediante inyección en la zona donde se desea inducir la diferenciación de células mesenquimales en osteoblastos.

Preferiblemente, los hidrogeles y las composiciones farmacéuticas de la invención permiten la liberación controlada o sostenida de la estatina.

15 Según se utiliza en el presente documento, el término "liberación controlada" o "liberación sostenida" se refiere a que la liberación de la estatina no es inmediata, sino gradual durante un periodo de tiempo. La velocidad de liberación de la estatina se puede controlar ajustando el contenido de ciclodextrina en el hidrogel.

En una realización particular, los hidrogeles y las composiciones farmacéuticas
20 de la invención permiten la liberación de la estatina durante al menos 2 días, al menos 5 días, al menos 7 días o al menos 10 días.

Los hidrogeles y las composiciones farmacéuticas de la invención también pueden ser útiles para favorecer o aumentar la osteointegración de implantes.

Por lo tanto, en otro aspecto, la invención se dirige a un implante que comprende
25 el hidrogel o la composición farmacéutica de la invención, por ejemplo un implante ortopédico o dental. En una realización particular, el hidrogel o composición farmacéutica de la invención se encuentra recubriendo el implante.

En otro aspecto, la invención se refiere al uso del hidrogel de la invención como vehículo para la administración de una molécula biológicamente activa adicional,
30 preferiblemente una proteína morfogénica.

En otro aspecto, la invención se refiere al uso del hidrogel de la invención para la preparación de un medicamento.

En otro aspecto, la invención se refiere al uso del hidrogel, o de la composición farmacéutica, de la invención para inducir o aumentar la diferenciación de células
35 mesenquimales a osteoblastos.

En otro aspecto, la invención se refiere al uso del hidrogel, o de la composición

farmacéutica, de la invención para la preparación de un medicamento para la reparación, regeneración o aumento de la formación de hueso.

En otro aspecto, la invención se refiere al uso del hidrogel, o de la composición farmacéutica, de la invención para la preparación de un medicamento para el tratamiento
 5 o la prevención de una enfermedad o condición seleccionada de osteoporosis, osteoartritis, osteopenia, enfermedad de Paget, fractura ósea, defectos críticos, pseudoartrosis, pérdidas de reserva ósea, hipocalcemia, erosiones periarticulares en artritis reumatoide, osteodistrofia, osteomalacia, lesiones osteolíticas producidas por metástasis de hueso, enfermedad ósea metastásica.

10 El término "tratamiento" o "tratar" tal y como se usa en este documento incluye la administración de un hidrogel o composición de la invención para intentar aliviar o curar la enfermedad o condición o sus síntomas o secuelas. El término tratamiento también incluye la prevención de la enfermedad o condición.

Los hidrogeles de la presente invención presentan grandes ventajas frente a otros
 15 sistemas para los que se ha descrito actividad osteogénica:

- presentan propiedades viscoelásticas adecuadas para su administración, e.g. mediante inyección, en el sitio deseado. Esto permite la administración local de simvastatina y poloxamina minimizando efectos secundarios sistémicos;
- son más baratos y estables que las alternativas que incorporan proteínas morfogénicas (tipo BMP-2);
- permiten reducir la proporción de poloxamina respecto a la formulación descrita en WO2011/144785, disminuyendo la posible citotoxicidad de la formulación, manteniendo la capacidad osteoinductora de las poloxaminas;
- permiten incorporar simvastatina solubilizándola y manteniéndola preferentemente
 25 en forma hidroxilácida;
- la combinación de poloxamina y simvastatina resulta en efectos osteogénicos sinérgicos;
- a diferencia de las composiciones que incorporan proteínas morfogénicas, los hidrogeles se pueden esterilizar mediante calor húmedo (autoclave) sin afectar a
 30 sus propiedades;
- pueden eliminarse por bioerosión.

Los ejemplos específicos que se proporcionan a continuación sirven para ilustrar la naturaleza de la presente invención. Estos ejemplos se incluyen solamente con fines
 35 ilustrativos y no han de ser interpretados como limitaciones a la invención que aquí se reivindica. Por tanto, los ejemplos descritos más adelante ilustran la invención sin limitar

el campo de aplicación de la misma.

EJEMPLOS

Materiales

- 5 Tetriconic® 908 (T908; número de unidades promedio EO = 115 por bloque y PO = 21 por bloque) fue de BASF Corporation (Ludwigshafen, Alemania) y α -ciclodextrina (α CD) de Wacker (Burghausen, Alemania). Simvastatina (peso molecular 418,57 Da) suministrada por AK Scientific, Inc. (Union City, USA). Sustrato de fosfatasa alcalina (ALP) y disolución de p-nitrofenilfosfato de Sigma-Aldrich (St. Louis Mo, USA); kit BCA de Pierce
10 (Rockford, IL, USA), y kit de proliferación celular (MTT) de Roche (Basel, Suiza). Células madre mesenquimales (StemPRO human adipose-derived stem cells), medio basal MesenPRO RS™ y suplemento de crecimiento MesenPRO RS™ fueron de Gibco (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA). Medio de cultivo Dulbecco's Modified Eagle medium (D-MEM) Nutrient mixture F-12 Ham sin rojo fenol fue de Sigma-Aldrich (USA). El agua
15 purificada (resistividad > 18,2 M Ω cm⁻¹) fue obtenida por osmosis inversa (MilliQ®, Millipore, Barcelona, España). Los demás reactivos fueron de calidad analítica.

Preparación de los geles

- Se prepararon por separado disoluciones de T908 y α CD en tampón fosfato (PBS) pH 7,4. A continuación, las disoluciones se mezclaron en diferentes proporciones para cubrir
20 un amplio intervalo de concentraciones en ambos componentes. La concentración de T908 se mantuvo siempre por debajo de la que requiere el copolímero sólo para formar geles. Una vez mezcladas las disoluciones en un vortex, se conservaron replicados de cada una de ellas a 4, 20 y 37 °C.

- Tabla 1. Composición y aspecto de las dispersiones acuosas de α CD:T908 transcurridas
25 24h desde su preparación.

T908 (% w/v)	α CD (% w/v)	α CD:EO relación molar	4 °C	20 °C	37 °C
1	0	0	Sol	Sol	Sol
1	2,5	0,141	Sol	Sol	Sol
1	5	0,283	Sol ^a	Gel ^b	2P
1	7	0,396	Gel	Gel	Gel
1	9,7	0,548	Gel	Gel	Gel
2	0	0	Sol	Sol	Sol
2	2,5	0,071	Sol ^a	Sol	Sol
2	5	0,141	Gel	Gel ^b	2P
2	7	0,198	Gel	Gel	Gel
2	9,7	0,274	Gel	Gel	Gel
3	0	0	Sol	Sol	Sol

3	2,5	0,047	Sol ^a	Sol	Sol
3	5	0,094	Gel	Gel ^b	2P
3	7	0,132	Gel	Gel	Gel
3	9,7	0,183	Gel	Gel	Gel
4	0	0	Sol	Sol	Sol
4	2,5	0,035	Sol ^a	Sol	Sol
4	5	0,071	Gel	Gel ^b	2P
4	7	0,099	Gel	Gel	Gel
4	9,7	0,137	Gel	Gel	Gel
5	0	0	Sol	Sol	Sol
5	2,5	0,028	Sol ^a	Sol	Sol
5	5	0,057	Gel	Gel ²	2P
5	7	0,079	Gel	Gel	Gel
5	9,7	0,110	Gel	Gel	Gel
8	0	0	Sol	Sol	Sol
8	2,5	0,018	Sol ^a	Sol	Sol
8	5	0,035	Gel	Gel ^b	2P
8	7	0,049	Gel	Gel	Gel
8	9,7	0,069	Gel	Gel	Gel
13	0	0	Sol	Sol	Sol
13	2,5	0,007	Sol ^a	Sol	Sol
13	5	0,014	Gel	Gel ^b	2P
13	7	0,020	Gel	Gel	Gel
13	9,7	0,027	Gel	Gel	Gel
2P: separación en dos fases ^a Dispersión turbia blanquecina ^b Gelificado después de 3 días.					

Pocos minutos (<5) después de que las disoluciones de T908 y α CD fuesen mezcladas, los sistemas se convirtieron en dispersiones turbias y a continuación en geles blanquecinos (Tabla 1), lo que está de acuerdo con el tiempo requerido para que se formen polipseudorotaxanos con bloques PEO tan largos como los de T908.

- 5 La formación del gel resultó más favorable a 4 °C ó 20 °C que a 37 °C. Sin embargo, una vez que los geles se formaron a 4 °C ó 20 °C, permanecieron estables durante al menos un mes. Importantemente, la temperatura puede entonces ser incrementada hasta 37 °C sin provocar la separación de fases.

Propiedades reológicas

- 10 Los módulos elástico o de almacenamiento (G') y viscoso o de pérdida (G'') de las dispersiones preparadas con T908 (1, 5, 8, 13, y 20%) sin y con α CD (5 ó 9,7%) fueron registrados a 0,5 Pa en el intervalo de frecuencias angulares de 0,5 a 50 rad/s usando una geometría cono-plato (diámetro 6 cm, ángulo 2°) a 10, 25 y 37 °C en un reómetro Rheolyst AR-1000N (TA Instruments, New Castle, UK) equipado con un analizador de datos AR2500 y un plato Peltier.
- 15

A temperatura inferior a la de gelificación, las disoluciones acuosas de poloxamina presentan un comportamiento reológico newtoniano. Por encima de la temperatura de gelificación, se transforman en sistemas viscoelásticos, y si se enfrían de nuevo, el gel vuelve a presentar la baja viscosidad inicial. En el intervalo de concentración del 1 a 13 %
 5 %, las dispersiones de T908 solo en PBS pH 7,4 mostraron valores bajos de G'' y por debajo del umbral de detección en el caso de G' incluso a 37 °C (Figura 1). La adición de α CD al 5 % provocó un aumento en G'' de casi 5 órdenes de magnitud, excepto en el caso de T908 al 1% que no se vio afectado. Además, los valores de G' superaron a los de G'' y resultaron ser independientes de la frecuencia angular, lo que es típico de una
 10 red tridimensional bien estructurada. Entre 10 °C y 37 °C, el aumento de temperatura no causó efectos relevantes sobre G' y G'' . La incorporación de más α CD hasta 9.7% condujo a entramados más viscoelásticos, incluso en el caso de T908 al 1%. Cabe destacar que los geles se pueden calentar en autoclave a 120°C durante 20 min sin provocar cambios en su comportamiento reológico. La incorporación de simvastatina a
 15 nivel de concentración μ M tampoco modificó las propiedades reológicas de los geles.

Ensayos de citocompatibilidad

Ensayo HET-CAM

Huevos de gallina fertilizados de menos de 3 días (Avirojo, Pontevedra, Spain) se incubaron durante 8 días a $37 \pm 0,3$ °C y $60 \pm 2,6$ % humedad relativa (Ineltec CCSP0150
 20 Tona, Barcelona, España). A continuación, se aplicó el protocolo de la ICCVAM para el test de la membrana corioalantoidea (HET-CAM). Se retiró la parte superior de la cáscara del huevo (correspondiente a la bolsa de aire) utilizando una cuchilla circular (Dremel 300, Breda, Holanda) y se humectó la membrana interna de los huevos con disolución de 0,9% (p/v) NaCl. Al cabo de 30 min, se retiró esa membrana con unas
 25 pinzas. Se depositaron alícuotas de dispersiones de T908- α CD (300 μ L a 25 °C) sobre la membrana corioalantoidea del huevo y se monitorizó su potencial irritante (hemorragia, lisis vascular y coagulación) durante 5 min. Como controles negativo y positivo se utilizaron disoluciones de 0,9% NaCl y 0,1 M NaOH, respectivamente. Los ensayos se llevaron a cabo por triplicado. El índice de irritación se calculó a partir del tiempo (en
 30 segundos) al que se inician los procesos de hemorragia (H), lisis (L) o coagulación (C), como sigue:

$$IS = \left[\left(\frac{301 - H_{\text{tiempo}}}{300} \right) \times 5 + \left(\frac{301 - L_{\text{tiempo}}}{300} \right) \times 7 + \left(\frac{301 - C_{\text{tiempo}}}{300} \right) \times 9 \right]$$

Según los valores de IS, los materiales se clasifican en no irritantes (0–0,9), débilmente irritantes (1–4,9), moderadamente irritantes (5–8,9) y severamente irritantes (9–21).

35 Como las α CDs libres pueden provocar hemólisis cuando se encuentran a altas

concentraciones, se evaluó la biocompatibilidad de formulaciones T908:αCD mediante el ensayo HET-CAM (*J. Biomed. Mater. Res.* 2002, 62, 273; *J. Biomed. Mater. Res. B Appl. Biomater.* 2012, 100B, 1425). Las disoluciones de αCD al 5 %, de T908 solo y de T908 con αCD al 5 % no dieron lugar a hemorragia, lisis o coagulación. Por lo tanto, su IS fue de 0,0, como se observó para el control negativo (0,9 % NaCl). En cambio, el IS del control positivo fue de 18,9 ± 0,3, como cabía esperar.

Viabilidad de osteoblastos

Se cultivaron células SAOS-2 (HTB-85, LGD Standards, ATCC, Manassas, VA) en medio D-MEM suplementado con suero fetal bovino (10% w/v) y gentamicina (0,1 mg/mL). Las células (50000 por pocillo; 0,5 mL) se sembraron en Millicell® 8-well glass EZ slide (Millipore) y se incorporaron 80 µL de cada muestra. Transcurridas 24 y 72 h se procedió a la tinción con calcio/yoduro de propidio (tampón fosfato:calceína:yoduro de propidio 98:1:1) para evaluar las células vivas y muertas mediante microscopía confocal (Leica TCS-SP2, Leica Microsystem GmbH, Mannheim, Alemania). Para el ensayo MTT de proliferación celular, se sembraron las células (200000 por pocillo; 1,5 mL) en placas de 24 pocillos a los que se incorporaron 200 µL de dispersiones de T908 (2, 4, 8 ó 13%)/αCD (0, 2,5, 5, 7 ó 9,7%). Como control se utilizaron células a las que no se incorporó la muestra de T908/αCD. Las placas se incubaron a 37°C durante 24 ó 72 h y se cuantificó la proliferación celular siguiendo las instrucciones del kit MTT (Roche). Todos los ensayos se llevaron a cabo por triplicado.

Las tinciones vivo/muerto y los ensayos MTT de células SAOS-2 (línea celular humana de osteoblastos) transcurridas 24 y 48 h de incubación con dispersiones de T908 (0-13 %) corroboraron la citocompatibilidad de este copolímero (Figura 2). La incorporación de cantidades crecientes de αCD dio lugar a una disminución progresiva en la viabilidad de los osteoblastos.

Solubilización y estabilidad de simvastatina

Se pesó simvastatina en viales a los que se incorporaron 5 ml de dispersión de T908 o de αCD en PBS, cubriendo un amplio intervalo de concentraciones. Los viales se mantuvieron bajo agitación magnética (50 rpm) a 25 °C durante 5 días y, a continuación, las dispersiones se filtraron a través de membranas de acetato de celulosa de 0,45 µm (Albet®, Barcelona, España) para retirar el fármaco no disuelto. La concentración de fármaco disuelto se midió por espectrofotometría UV a 239 nm (Agilent 8453, Waldbronn, Alemania).

La determinación de las formas lactona e hidroxácido de la simvastatina se llevó a cabo por HPLC usando una columna LiChroCART RP-C18 (3,9 x 150 mm, 5 µM) a 25 °C,

detector UV-vis diode array (238 nm, L-4500 Merck-Hitachi, Alemania) y acetonitrilo:28 mM tampón fosfato pH 4 (65:35, 1 mL/min flujo) como fase móvil isocrática. El método mostró una buena precisión (< 3,5 % desviación estándar relativa). El límite de cuantificación fue de 0,18 μ M para la forma lactona (tiempo de retención 6 min) y 0,22 μ M para la forma hidroxilada (tiempo de retención 3 min). Este método de HPLC fue también utilizado para evaluar la estabilidad del fármaco en formulaciones almacenadas a 4 °C durante 65 días.

La actividad osteogénica de la simvastatina ha sido atribuida a la forma hidroxilada, que debería ser la predominante a pH 7,4. Por lo tanto, la capacidad de α CD y T908 por separado para solubilizar simvastatina se evaluó a este pH. α CD mostró una capacidad relativamente baja para solubilizar simvastatina a pH 7,4 (Tabla 2). A la concentración de α CD más alta ensayada (9,7%) la solubilidad aparente de simvastatina se incrementó 5 veces en comparación con la registrada en agua. Por otra parte, a concentraciones superiores a la concentración crítica micelar (CMC = 1 %), un aumento de la concentración de T908 dio lugar a incrementos progresivos en la solubilidad de la simvastatina. Sólo en los sistemas preparados con T908 al 10% o más, la forma lactona pudo ser detectada, pero en una proporción muy baja. Estos resultados indican que el efecto protector que las poloxaminas pueden ejercer sobre el anillo lactona es muy bajo a pH 7.4. Así, a este pH no es esperable que las poloxaminas afecten negativamente a la actividad osteogénica/osteoinductiva de la simvastatina. Además, la monitorización durante 65 días de las dos formas de simvastatina en dispersiones de T908 almacenadas a 4 °C no reveló cambios en la proporción entre las formas lactona e hidroxilado.

Tabla 2. Solubilidad aparente y relación molar lactona/hidroxilado de la simvastatina en disoluciones de α -CD o T908 en tampón fosfato de pH 7,4.

Medio	Solubilidad de la simvastatina mg/mL (SD $\times 10^{-4}$)	f_s	X^a	P^b	Simvastatina / PO (mg/g)	Relación molar lactona / hidroxilado ^c
H ₂ O	0,0018 (1,3)	—	—	—	—	1:1
Tampón fosfato pH 7.4	0,0032 (5,3)	—	—	—	—	0,9:1
2,5% α -CD	0,0082 (3,2)	2,56	—	—	—	0:1
5% α -CD	0,0104 (6,4)	3,25	—	—	—	0:1
7% α -CD	0,0125 (7,7)	3,91	—	—	—	0:1
9,7% α -CD	0,0167 (7,9)	5,22	—	—	—	0,01:1
1% T908	0,0063 (4,9)	1,97	0,000	2,50	3,173	0:1
2% T908	0,0080 (2,5)	2,50	0,037	3,44	2,012	0:1
3% T908	0,0100 (2,6)	3,13	0,024	4,56	1,669	0:1

4% T908	0,0123 (4,4)	3,84	0,021	5,83	1,534	0:1
5% T908	0,0144 (4,4)	4,50	0,019	7,00	1,441	0:1
8% T908	0,0220 (8,8)	6,88	0,017	11,22	1,373	0:1
10% T908	0,0259 (4.6)	8,09	0,016	13,39	1,296	0,1:1
13% T908	0,0395 (13.6)	12,34	0,019	20,94	1,518	0,1:1
20% T908	0,2468 (18.2)	77,13	0,077	136,11	6,172	0,2:1

^a número de moles que se pueden solubilizar por mol de copolímero en estado micelar;

^b coeficiente de reparto micela/agua, es decir, relación de concentraciones de fármaco en la micela con respecto a la concentración de fármaco en agua.

5 Cesión de simvastatina

Se prepararon dispersiones de T908 a las que se incorporó simvastatina a una concentración fija de 50 μ M (0,0209 mg/ml), y a continuación se incorporó α CD. La cesión de simvastatina se evaluó en células de difusión verticales Franz-Chien. La muestra (2 ml) se dispuso en el compartimento superior, que se separó del receptor (6 ml de PBS, 37°C, agitación magnética) por medio de un filtro de acetato de celulosa (0,45 μ m, Albet®, Barcelona, España). La superficie disponible para la difusión fue de 0,785 cm². A tiempos preestablecidos se retiraron 300 μ L del receptor (reemplazados con el mismo volumen de PBS a 37°C) y se cuantificó la simvastatina cedida (contenido total y formas lactona e hidroxilada) utilizando el procedimiento de HPLC descrito antes.

El proceso de cesión resultó más lento al aumentar la concentración de T908 (Figura 3). La incorporación de simvastatina a las dispersiones de T908 no alteró el proceso de gelificación subsecuente a la adición de α CD. La gelificación condujo a perfiles de cesión más sostenidos; los geles de T908- α CD controlaron la cesión de simvastatina durante más de una semana. Los coeficientes de difusión se calcularon a partir de la pendiente de la recta obtenida al ajustar los perfiles de cesión a la ecuación de Higuchi:

$$\frac{Q}{A} = 2C_0 \left(\frac{Dt}{\pi} \right)^{\frac{1}{2}}$$

en la que Q representa la cantidad de fármaco (mg) cedida a tiempo t (s), A es el área de difusión (cm²), C₀ es la concentración inicial de simvastatina en la formulación (mg/ml), y D es el coeficiente de difusión (cm²/s).

Se encontró una correlación negativa entre el contenido en α CD y los valores de los coeficientes de difusión. En general, la adición de α CD al 5 % redujo a la mitad los valores de los coeficientes de difusión, mientras que al 9,7 % los valores fueron entre 3 y 4 veces más pequeños que los registrados para las dispersiones de T908 solo. Estos resultados concuerdan con el aumento de viscosidad al que da lugar la formación de los polipseudorotaxanos.

Ensayo fosfatasa alcalina (ALP)

MSCs se cultivaron en medio MesenPRO RS (Gibco, Invitrogen) suplementado con 1% glutamina y 1% penicilina y estreptomocina. Después se sembraron (30000 células/pocillo, 2,5 mL) en placas de 6 pocillos. 200 µL de dispersiones de T908 (4% ó 8%) sin y con α CD (5%) y sin y con simvastatina (0,08 µM ó 8,5 µM, preparadas como se

5 indicó para el ensayo de liberación) se depositaron en el compartimento superior de pocillos Transwell permeables. Como controles negativo y positivo se utilizaron células en medio de cultivo y en medio de diferenciación osteogénica (10 µM β -glicerofosfato, 100 nM dexametasona y 50 µM ácido ascórbico), respectivamente. Las placas se incubaron a 37°C en atmósfera húmeda con 5% CO₂. El medio se reemplazó dos veces

10 por semana y las células se observaron con microscopio invertido (x10) para descartar posible contaminación por bacterias. Cada experimento se realizó dos veces independientes, cada una de ellas por duplicado. La actividad fosfatasa alcalina (ALP) se determinó a los 3, 7 y 12 días. Para ello, las células se lisaron mediante adición de 150 µL de tampón Tris HCl 10 mM, pH 7,5, con 0,1% Triton X-100 y se sometieron a 3 ciclos

15 de congelación (-80 °C durante 45 minutos)/descongelación. Los lisados se centrifugaron a 14000 rpm durante 15 min a 4 °C. Alícuotas (50 µL) de los lisados se incubaron con sustrato ALP (150 µL) en placas de 96 pocillos a 37 °C durante 30 min y la absorbancia se cuantificó a 405 nm utilizando un lector BIORAD Model 680 Microplate Reader. La concentración de ALP se determinó utilizando una curva de calibración de p-nitrofenilfosfato. Cada medida de ALP se normalizó por el contenido en proteínas determinado usando el ensayo BCA (*European Cells and Materials*, 2011;21:317-40). Los resultados se expresan como nmoles de ALP por minuto y mg de proteína.

La tinción histoquímica se realizó a los días 7 y 12. Brevemente, el medio se retiró y las células se fijaron utilizando una disolución de paraformaldehído al 4% durante 5 min, se

25 lavaron con tampón fosfato, se incubaron en la oscuridad con 0,1% naftol ASMX-fosfato y 0,1 % violeta rápido en 56 mM AMPD (2-amino-2-metil propanodiol) durante 10 min, y observaron con un microscopio óptico.

Proliferación celular

MSCs se cultivaron como se indica arriba y a los 3, 7 y 12 días de incubación, se

30 retiraron los compartimentos transwell y 1,5 mL de medio de cultivo. A continuación, 100 µL de disolución MTT (5 mg/mL en PBS) se incorporaron a cada pocillo conteniendo 1 mL de medio de cultivo remanente y las placas se incubaron 4 h a 37 °C. A continuación, se adicionó 1 mL de disolvente MTT (10% SDS en 0,01 M HCl) y las placas se incubaron toda la noche a 37 °C. Alícuotas de medio se procesaron como se indica en el kit de

35 proliferación celular (Roche).

Análisis estadístico

La viabilidad de osteoblastos, los coeficientes de difusión de simvastatina, la proliferación de MSCs y los niveles de ALP obtenidos para formulaciones con concentración fija de T908 y proporciones variables de α CD se analizaron usando ANOVA y un test de rangos múltiple (Statgraphics Centurion XVI 1.15, StatPoint Technologies Inc., Warrenton VA).

5 Se evaluó la proliferación y la diferenciación de MSCs a osteoblastos en medios de cultivo a los que se adicionó simvastatina en concentraciones comprendidas entre 0,01 y 5 μ M (0,08 a 42,5 μ M en la disolución de PBS de partida; Tabla 3). Comparado con el control negativo, la simvastatina dio lugar a una proliferación celular similar en los 3 primeros días, pero a una disminución en los días 7 y 12, aunque con valores superiores a los del control positivo (Figura 4). La actividad ALP fue máxima el día 7 para 0,1, 1 y 5 μ M simvastatina, alcanzando valores similares a los encontrados con el control positivo (Figura 5). En el día 12 la actividad de la proteína disminuyó en presencia de simvastatina, excepto en el medio que contiene la concentración más baja probada (0,01 μ M). Por lo tanto, se seleccionaron las concentraciones 0,01 y 1 μ M de simvastatina para los estudios siguientes con los geles supramoleculares de T908- α CD (preparados con 0,08 y 8,5 μ M simvastatina para dar lugar a 0,01 y 1 μ M cuando se incorporaron al medio celular). Los estudios de osteogenicidad se llevaron a cabo con los sistemas T908- α CD que contienen 4 ó 8 % de copolímero y 5 % de α CD. Los geles supramoleculares mostraron una buena citocompatibilidad y efectos proliferativos sobre MSCs en la primera semana (Figura 6) e indujeron la diferenciación a osteoblastos a continuación (Figura 7). El número de células estuvo entre las cuantificadas en los controles negativo y positivo (osteogénico) (Figura 6). Comparado con el T908 al 4 ó 8 %, la incorporación de α CD y/o simvastatina no causó efectos perjudiciales sobre la proliferación de las células. Además, la actividad ALP fue considerablemente mayor (ANOVA y test de rango múltiple, $p < 0.05$) para los sistemas que contienen T908 y α CD, en comparación con las dispersiones de solo T908 a los días 3 y 7, y la incorporación de simvastatina 8,5 μ M (es decir, 1 μ M en el medio de cultivo) aumentó aún más la actividad ALP en los días 7 y 12 con respecto a los geles preparados sin fármaco (Figura 7). Los valores de ALP obtenidos están en el intervalo de los registrados en estudios previos con geles conteniendo rhBMP-2 (*Eur. Cell. Mater.* 2011, 21, 317).

La diferenciación de MSCs a osteoblastos también se confirmó mediante la tinción histoquímica de ALP, utilizando un microscopio invertido (Figura 8). En el medio de control negativo, las MSCs formaron monocapas homogéneas, con un alto índice de proliferación (Figura 8A). En el medio osteoinductivo (control positivo; Figura 8B), la forma poligonal de osteoblastos era evidente desde el día 7 con una intensa tinción. En

el caso de las formulaciones con T908 en el día 12 (Figura 8 de E a Q), en ausencia de α CD el número de células fue más alto. Las células cultivadas en presencia de simvastatina mostraron más claramente la forma característica de osteoblastos. La tinción fue más intensa en presencia de α CD. Por lo tanto, los sistemas

5 supramoleculares poloxamina-ciclodextrina-simvastatina ejercen efectos osteogénicos/osteoinductivos sinérgicos.

un valor medio de a entre 112 y 116, un valor medio de b entre 18 y 22 y un peso molecular promedio entre 20000 y 30000 Da, y la ciclodextrina es α -ciclodextrina.

- 5 10. Hidrogel según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, donde la estatina es simvastatina.
11. Uso de un hidrogel según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10 para la preparación de un medicamento.
- 10 12. Uso de un hidrogel según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10 para inducir o aumentar la diferenciación de células mesenquimales a osteoblastos
- 15 13. Uso de un hidrogel según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10 para la preparación de un medicamento para la reparación, regeneración o aumento de la formación de hueso.
- 20 14. Uso de un hidrogel según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10 para la preparación de un medicamento para el tratamiento o la prevención de una enfermedad o condición seleccionada de osteoporosis, osteoartritis, osteopenia, enfermedad de Paget, fractura ósea, defectos críticos, pseudoartrosis, pérdidas de reserva ósea, hipocalcemia, erosiones periarticulares en artritis reumatoide, osteodistrofia, osteomalacia, lesiones osteolíticas producidas por metástasis de hueso, enfermedad ósea metastásica.
- 25 15. Composición farmacéutica que comprende un hidrogel según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10 y un excipiente farmacéuticamente aceptable.
- 30 16. Composición según la reivindicación 15, donde la composición farmacéutica es una composición inyectable.
17. Composición según cualquiera de las reivindicaciones 15 o 16, donde la composición farmacéutica es una composición de cesión controlada.
- 35 18. Implante que comprende un hidrogel según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10.

19. Implante según la reivindicación 18 seleccionado de implante dental e implante ortopédico.
- 5 20. Método *in vitro* para inducir la diferenciación de células mesenquimales, excepto células madre embrionarias humanas, en osteoblastos que comprende poner en contacto (a) un hidrogel según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10, con (b) células mesenquimales, excepto células madre embrionarias humanas, que se encuentran en un medio de cultivo.

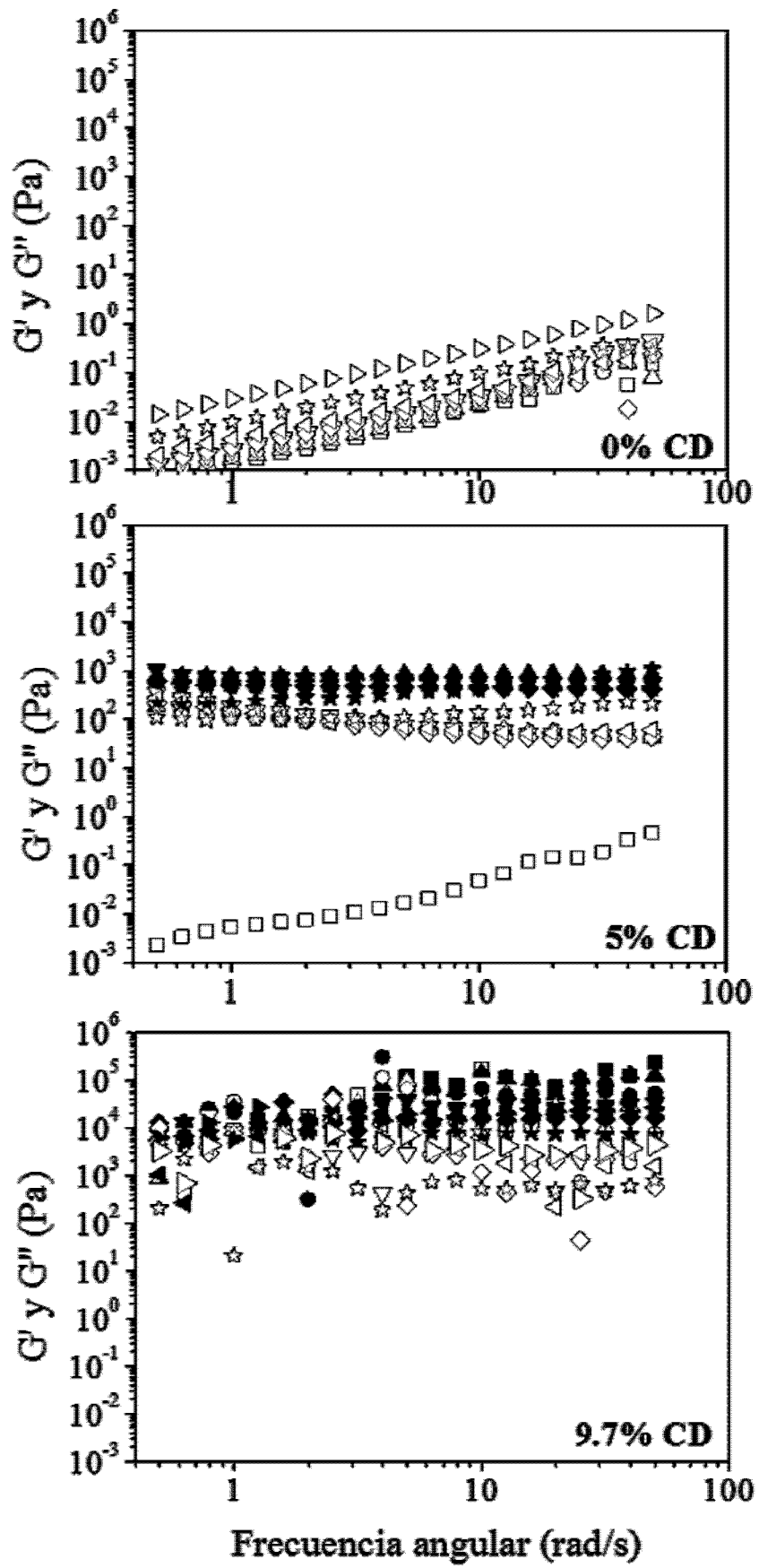


Figura 1

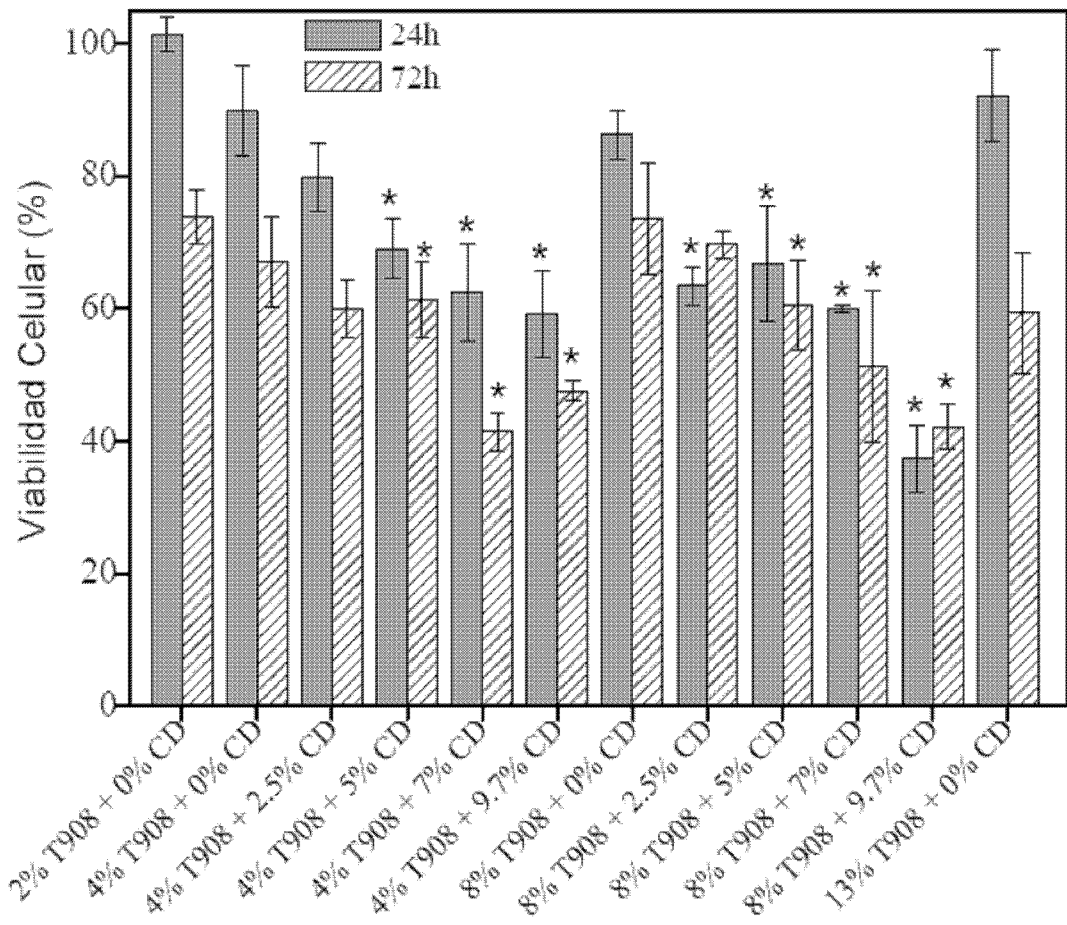


Figura 2

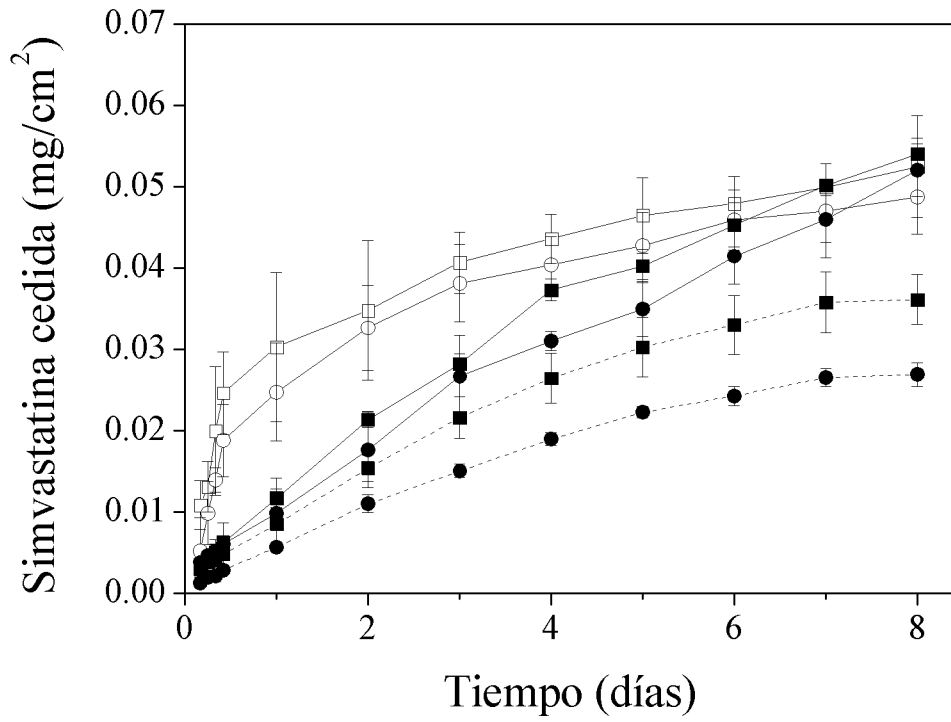


Figura 3

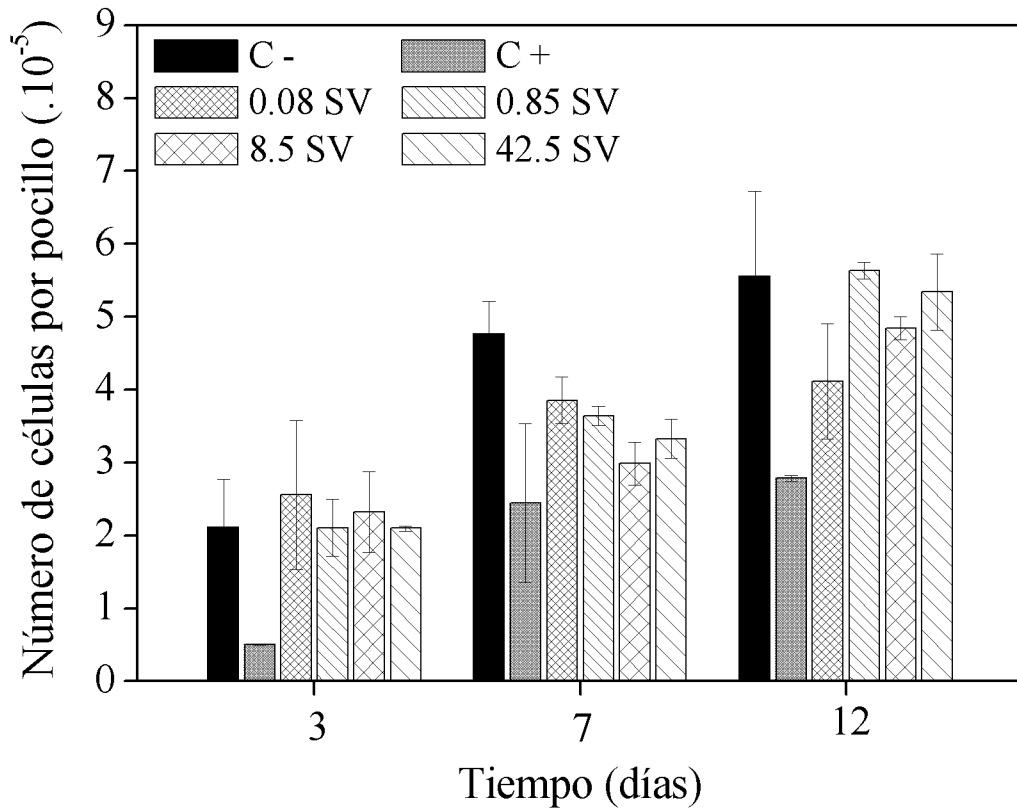


Figura 4

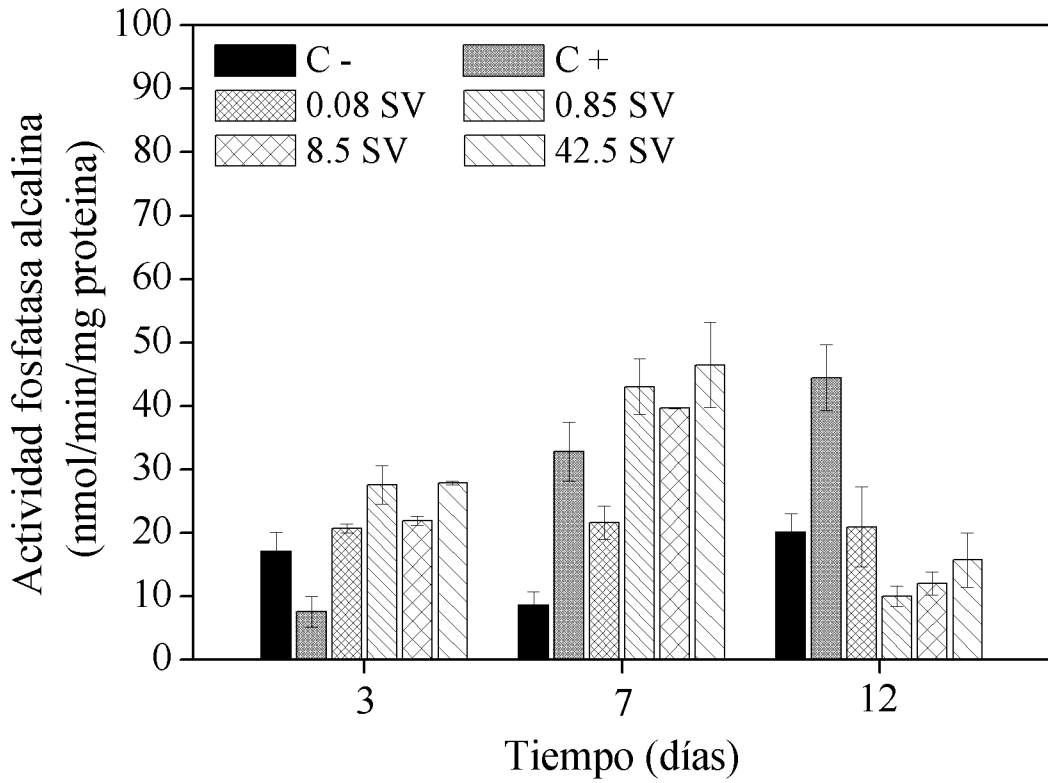


Figura 5

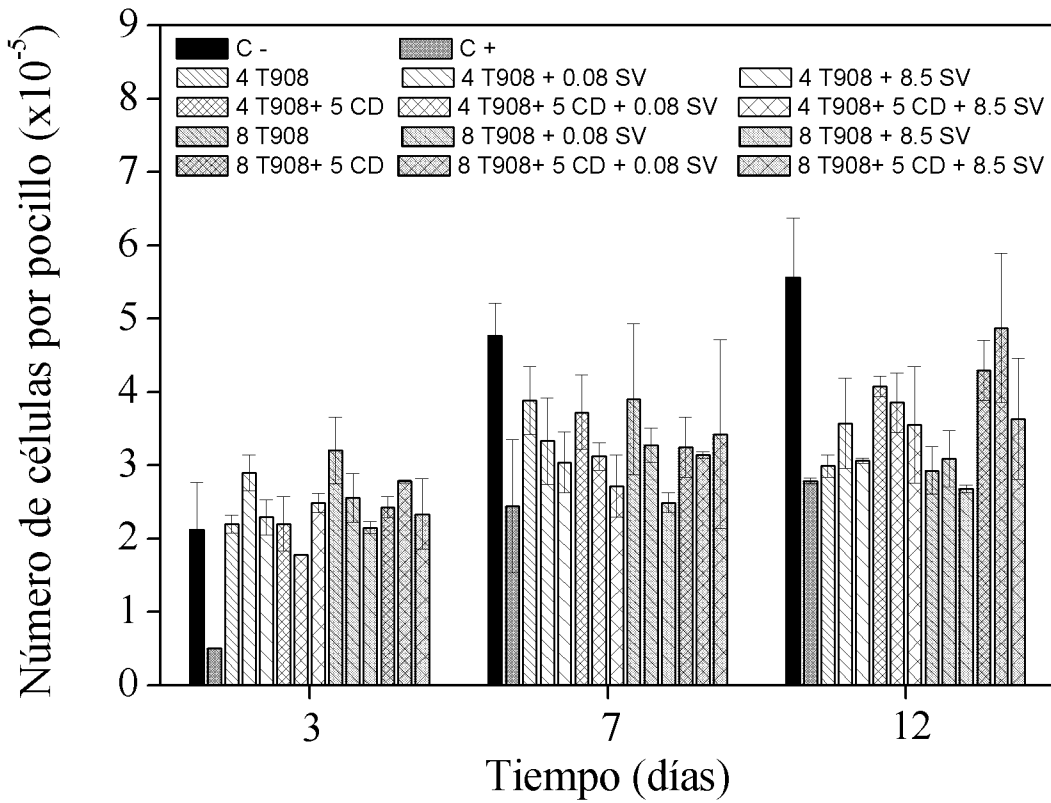


Figura 6

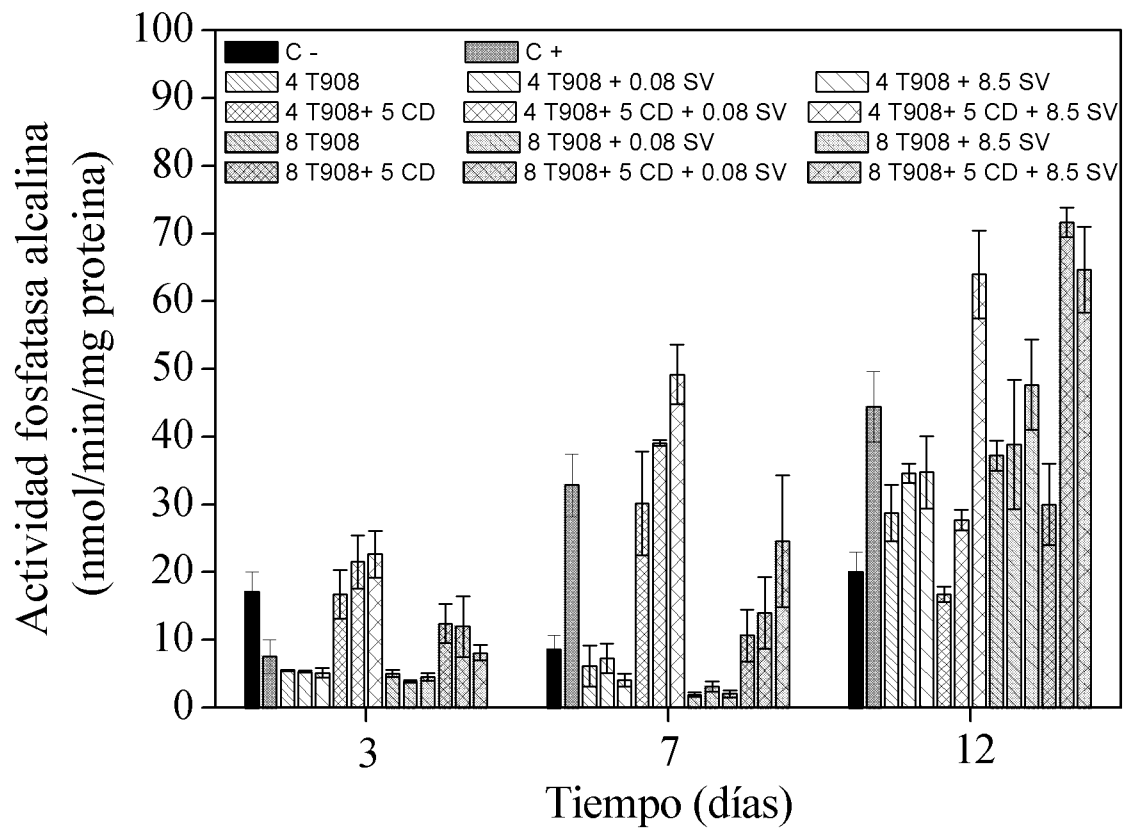


Figura 7

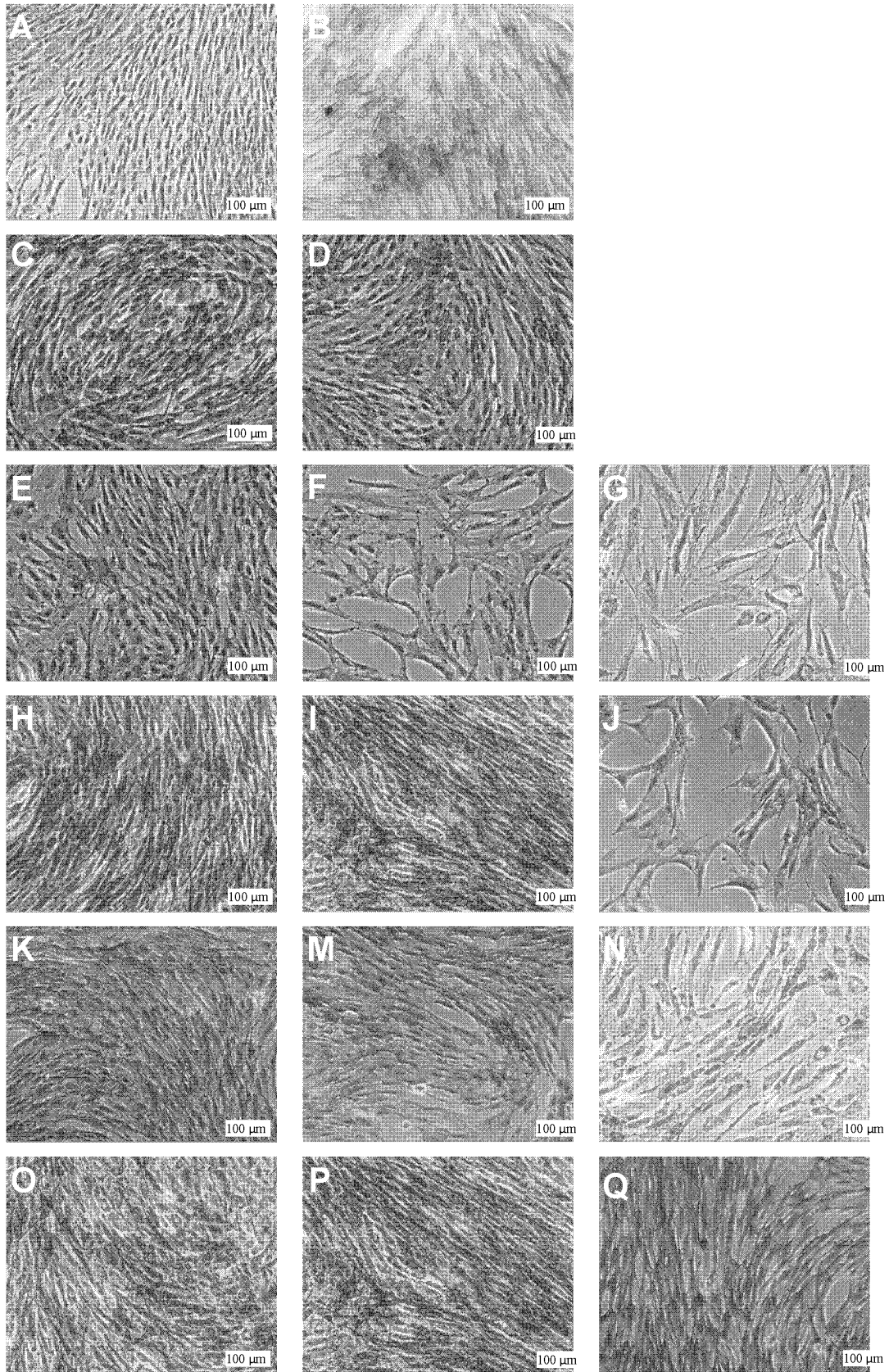


Figura 8