



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



① Número de publicación: **2 344 097**

② Número de solicitud: 200900438

⑤ Int. Cl.:  
**A61K 38/16** (2006.01)  
**A61K 47/48** (2006.01)  
**A61L 27/22** (2006.01)  
**A61P 9/14** (2006.01)  
**C12N 15/00** (2006.01)

⑫

PATENTE DE INVENCION

B1

⑫ Fecha de presentación: **16.02.2009**

⑬ Fecha de publicación de la solicitud: **17.08.2010**

Fecha de la concesión: **08.06.2011**

⑮ Fecha de anuncio de la concesión: **20.06.2011**

⑯ Fecha de publicación del folleto de la patente:  
**20.06.2011**

⑰ Titular/es: **Universidad de Valladolid  
Plaza de Santa Cruz, 5 - Bajo  
47002 Valladolid, ES**

⑱ Inventor/es: **Martín Maroto, Laura;  
Rodríguez Cabello, José Carlos;  
Alonso Rodrigo, Matilde;  
Arias Vallejo, Francisco Javier;  
Testera Gorgojo, Ana María y  
Girotti, Alessandra**

⑲ Agente: **Pons Ariño, Ángel**

⑳ Título: **Biopolímero, implante que lo comprende y sus usos.**

㉑ Resumen:

Biopolímero, implante que lo comprende y sus usos.

La presente invención se refiere a un biopolímero, bioactivo y totalmente biocompatible, muy fluido a temperatura ambiente y con capacidad de gelificar de forma brusca a 37°C; formando un implante sólido estructuralmente íntegro, continuo y con altas prestaciones mecánicas. El biopolímero comprende al menos un dominio bioactivo capaz de dirigir de forma precisa la formación de un implante sólido o semi-sólido. Asimismo la invención se refiere a cualquiera de los ácidos nucleicos que codifican para la secuencia aminoacídica del biopolímero, implantes, vehículos farmacéuticamente aceptables, a sus usos y a un método de síntesis del mismo.

ES 2 344 097 B1

Aviso: Se puede realizar consulta prevista por el art. 37.3.8 LP.

## DESCRIPCIÓN

Biopolímero, implante que lo comprende y sus usos.

5 La presente invención se refiere a un biopolímero, bioactivo y totalmente biocompatible, muy fluido a temperatura ambiente y con capacidad de gelificar de forma brusca a 37°C; formando un implante sólido estructuralmente íntegro, continuo y con altas prestaciones mecánicas. El biopolímero comprende al menos un dominio bioactivo capaz de dirigir de forma precisa la formación de un implante sólido o semi-sólido. Asimismo la invención se refiere a cualquiera de los ácidos nucleicos que codifican para la secuencia aminoacídica del biopolímero, implantes, vehículos farmacéuticamente aceptables, a sus usos y a un método de síntesis del mismo.

## Estado de la técnica anterior

15 Los implantes de materiales biomédicos macroscópicos sólidos pueden clasificarse en 2 categorías: (1) implantes carentes de integridad estructural o no continuos y (2) materiales que forman un implante estructuralmente íntegro o continuo. La primera estrategia se basa en implantes de micro o nanopartículas suspendidas en un vehículo biocompatible (Gamisans *et al.*, 1999. *Int J Pharm*, 79: 37-48; Igartua *et al.*, 1998. *J Control Rel*; 56: 63-73; Brannon-Peppas L, 1995. *Controlled release of<sup>®</sup>-estradiol from biodegradable microparticles within silicone matrix*; In: *Polymer Biomaterials in Solution, as Interfaces and as Solids*. 1st ed. Utrech (The Netherlands): VSP-Utrecht; Kawaguchi H, 2000. *Prog Polym Sci*, 25: 1171-1210). Debido a que no poseen propiedades mecánicas, estos implantes pueden migrar del sitio de inserción. Para superar esta desventaja, se han diseñado sistemas que combinan baja viscosidad y alta fluidez al momento de la inyección con un aumento pronunciado en las propiedades mecánicas *a posteriori*, que resulta en la formación de un implante sólido y con límites bien definidos.

25 Las familias de biomateriales inyectables existentes se pueden resumir en a) Pastas Termoplásticas, b) Precipitación *In Situ*, c) Sistemas Polimerizables o Entrecruzables *In Situ*, d) Materiales Inteligentes y e) Sistemas de Estrategia Combinada.

30 Las pastas termoplásticas que despliegan un aumento de viscosidad son materiales de bajo peso molecular caracterizados por una baja temperatura de transición vítrea (Tg) y una temperatura de fusión (Tm) entre 37°C y 65°C. Así, las pastas son inyectadas en estado fundido (en general a una temperatura por encima de la temperatura corporal) y la cristalización gradual en el cuerpo resulta en la solidificación y formación de un implante continuo (Hatefi *et al.*, 2002. *J Control Rel*, 80: 9-28). Los polímeros más importantes para el desarrollo de estos implantes son policaprolactona (PCL), ácidos poliláctico (PLA), poliglicólico (PGA) y polidioxanona (PDO), poliortoésteres (POEs), entre otros.

35 Sosnik y Cohn diseñaron una modificación de esta estrategia mediante la síntesis de oligómeros segmentados de polietilenglicol y PCL que combinaron inyectabilidad mejorada y endurecimiento gradual a 37°C a lo largo del tiempo (Sosnik *et al.*, 2003. *Polymer*, 44: 7033-7042).

40 Los materiales inteligentes son aquellos que despliegan un cambio abrupto en una de sus propiedades (por ejemplo viscosidad) ante un pequeño cambio en las condiciones del entorno. El estímulo puede ser físico (p.e. temperatura, fuerza iónica, campo magnético o eléctrico, estrés mecánico), químico (p.e. pH) o bioquímico (p.e. sustrato de enzimas o ligandos específicos) (Hoffman *et al.*, 2000. *J Biomed Mater Res Part A*, 52: 577-586).

45 Las soluciones acuosas de los materiales inteligentes tienen baja viscosidad a temperatura ambiente y exhiben un aumento con el calentamiento formando un gel semi-sólido o sólido cuando alcanzan la temperatura fisiológica. Esta transición se observa generalmente en un estrecho intervalo de temperatura. Existen varios polímeros que presentan este comportamiento. Entre ellos, cabe destacar la poli-N-isopropilacrilamida (PNIPAAm) (Peppas *et al.*, 2000. *Eur J Pharm Biopharm*, 50: 27-46), copolímeros segmentados de poli(óxido de etileno)-poli(óxido de propileno) (PEO-PPO) (Bromberg *et al.*, 1998. *Adv Drug Del Rev*, 31: 197-221), copolímeros segmentados de poli(óxido de etileno)-poliésteres (PEO-PLA, PEO-PCL) (Jeong *et al.*, 1999. *J Control Rel*, 62: 109-114) y otras moléculas anfífilas diseñadas alternando segmentos hidrofílicos e hidrofóbicos (Lee *et al.*, 2002. *Macromolecules*, 35: 3876-3879). Una de las desventajas presentada por los polímeros comerciales de PEO y PPO es la no degradabilidad de la cadena polietérica en el medio biológico.

55 La combinación de las técnicas anteriores ha dado lugar a implantes que presentan propiedades de dos grupos de materiales anteriormente descritos: (1) aumento de la viscosidad con el incremento de la temperatura y (2) entrecruzamiento covalente para obtener propiedades mecánicas robustas y mayor estabilidad estructural. Así, el implante puede ser insertado en forma líquida, gelificar a 37°C para formar un gel semi-sólido y finalmente ser estabilizado por entrecruzamiento covalente. En muchos casos estos polímeros van acompañados de disolventes y reactivos orgánicos. Las limitaciones más importantes de los Poli-N-isopropilacrilamida (PoliNIPAAm) que son algunos de los polímeros termosensibles inversos más populares son la no degradabilidad de las matrices puras y la pérdida de volumen o contracción durante el calentamiento.

65 Es conocido que las proteínas recombinantes tipo elastina (ELR) que se usan como polímeros biocompatibles, son altamente versátiles, puesto que estas características se pueden modificar y ampliar insertando los aminoácidos de dominios funcionales extraídos de otras proteínas o diseños naturales *de novo* (Rodríguez-Cabello JC, Prieto S, Reguera J, Arias FJ y Ribeiro A. (2007). *J. Biomater. Sci. Polymer Edn*, 18(3): 269-286). En dicha revisión también

se comenta que recientemente, el potencial demostrado de los polímeros ELR ha sido amplificado por el uso de las tecnologías de ADN recombinantes. Esta revisión explora el actual desarrollo de los polímeros ELR, con un énfasis particular en las aplicaciones biomédicas.

5 También es conocido que en la cadena del biopolímero se pueden insertar péptidos que contengan dominios bioactivos como por ejemplo RGD (R = L-arginina, G = glicina y D = ácido L-aspártico) o REDV (E = ácido L-glutámico y V = L-valina) que dotan a los biopolímeros de una alta capacidad de unión a diversos tipos celulares.

10 Otra familia de materiales de suma importancia son los polímeros segmentados de PEO y PPO, comercialmente conocidos como *Pluronic* (lineales y bifuncionales) y *Tetronic* (ramificados y tetrafuncionales) que no presentan contracción de volumen como los PoliNIPAAm, pero que, como contrapartida, aun en casos donde los materiales comerciales presentan la transición sol-gel, los niveles de viscosidad alcanzados no son lo suficientemente elevados para la mayoría de las aplicaciones clínicas. Es decir, las propiedades mecánicas de los polímeros PEO y PPO son insatisfactorias y los geles muestran excesiva permeabilidad al agua y consecuentemente tiempos de residencia sumamente cortos en el sitio del implante. Por este motivo y para situaciones semejantes se recurre a estrategias combinadas con el objeto de prevenir la reabsorción del implante inmediatamente después de la inserción, mediante el aumento pronunciado de la viscosidad, y un posterior entrecruzamiento covalente para alcanzar propiedades mecánicas robustas y de mayor estabilidad. De esta manera se obtienen hidrogeles con módulos de 415 kPa pero con el consecuente aumento del tiempo necesario para alcanzar la consistencia deseada ya que en este caso se debe producir una reacción de entrecruzamiento en condiciones fisiológicas que serán superiores a la hora.

15 A pesar de que se han venido ensayando mediante diferentes estructuras basadas en proteínas ELR, no se ha conseguido sintetizar un biopolímero que no presente una dilución apreciable del implante. Este hecho es debido a que la gelificación de este tipo de polímeros todavía es demasiado lenta. Esta dilución del implante disminuye la eficacia del mismo.

20 Por tanto se hace necesario resolver la dificultad de conseguir una gelificación lo suficientemente rápida y selectiva para producir un implante sólido eficaz.

30

### Explicación de la invención

35 La presente invención se refiere a un biopolímero, bioactivo y biocompatible, muy fluido a temperatura ambiente y con capacidad de gelificar de forma brusca a 37°C formando un implante sólido estructuralmente íntegro, continuo y con altas prestaciones mecánicas. El biopolímero comprende al menos un dominio bioactivo capaz de dirigir de forma precisa la formación de un implante sólido o semi-sólido de manera que además de formar el implante presenta biofuncionalidades como interactuar con células en el organismo, o introducirlas actuando como sistema de terapia celular (medicina regenerativa); también puede actuar como sistema de liberación controlada de fármacos, inducir nucleación inorgánica, etc. Asimismo la invención se refiere a cualquiera de los ácidos nucleicos que codifican para la secuencia aminoacídica del biopolímero, implantes, vehículos farmacéuticamente aceptables, a sus usos y a un método de síntesis del mismo.

40 El biopolímero de la presente invención es un copolímero ya que está formado por varios monómeros. El término copolímero es un sinónimo de heteropolímero. Los monómeros son péptidos de 5 aminoácidos (pentapéptidos) que se pueden unir de diferentes formas por medio de enlaces químicos.

45 En la presente invención se han obtenido sistemas autogelificables a partir de polímeros proteicos tipo elastina con un alto grado de eficiencia, complejidad, control y robustez. Los biopolímeros de la presente invención se han conseguido empleando las siguientes herramientas:

50

- Conocimiento sobre las fuerzas hidrofóbicas y elásticas de los aminoácidos. De este modo se puede disponer de un control preciso y cuantitativo de cuánto de hidrofóbico o hidrofílico ha de ser cada pentapéptido en el biopolímero. Partiendo de este conocimiento y del fenómeno de transición inversa ( $T_1$ ) que se da en estos materiales, se construyeron biopolímeros tipo elastina autogelificables mediante estructuras que alternan pentapéptidos hidrofílicos y pentapéptidos hidrofóbicos de manera que las interacciones entre los pentapéptidos hidrofóbicos, en disoluciones acuosas, son vitales para producir el fenómeno de autogelificación deseado por encima de una temperatura determinada.
- 55 - Uso de la tecnología de ADN recombinante mediante la clonación de una secuencia de ácidos nucleicos que codifica para la secuencia aminoacídica del biopolímero de la presente invención en un vector capaz de expresar dicha secuencia. Mediante esta tecnología se aprovecha la maquinaria de replicación, transcripción y traducción de los organismos para producir los biopolímeros.
- 60 - Biocompatibilidad de los biopolímeros basados en secuencias de polipéptidos ELP (*Elastin-Like Polypeptide*). Ésta es una característica útil en el desarrollo de sistemas que funcionen en contacto con tejidos vivos o fluidos específicos. Los ELPs no pueden ser distinguidos de la elastina natural por el sistema inmune por lo que su biocompatibilidad puede considerarse extrema.
- 65

## ES 2 344 097 B1

Por tanto, aprovechando estas herramientas, los biopolímeros recombinantes (producidos por medio de la tecnología de ADN recombinante), adquieren la capacidad de autoensamblado y permiten el desarrollo de sistemas nanométricos. Con esta nueva estrategia se consiguen sistemas y propiedades de autoensamblado con características claramente superiores a los descritos en la actualidad.

Los biopolímeros de la presente invención presentan varias ventajas respecto de otros copolímeros conocidos del estado de la técnica:

- Tiene al menos una secuencia con un dominio bioactivo de modo que de esta manera el biopolímero se adhiere a las células específicas para el que se ha diseñado y se produce la gelificación, obteniendo un material con un módulo elástico de compresión orden de  $10^5$  Pa.
- El tiempo de gelificación desde que se administra el biopolímero (normalmente por inyección) es de entre 1 y 3 minutos a  $37^\circ\text{C}$  para un biopolímero con una concentración de entre 150 y 200 mg/ml.

La gelificación rápida es muy importante para evitar una dilución apreciable del implante en el entorno biológico, lo que puede disminuir la eficacia del implante. Puesto que la gelificación se produce en un intervalo de tiempo tan corto, es muy importante dirigir el biopolímero al tejido específico de interés, consiguiendo de este modo un implante sólido selectivo.

Los biopolímeros pueden formar un implante sólido, estructuralmente íntegro y con altas prestaciones mecánicas en unos minutos sin necesidad de entrecruzamiento. Los polímeros se pueden aplicar en terapias para el daño en tejido nervioso y médula espinal, en terapias para el daño en cartílagos y hueso (incluyendo secuencias capaces de inducir nucleación inorgánica), en la prevención de cicatrices (incluyendo secuencias antiadherentes como por ejemplo SEQ ID NO: 1), en el tratamiento de necrosación de varices, en aumento de tejidos, en tratamiento de enfermedades mediante la liberación controlada de fármacos (incluidos en dicho biopolímero). En definitiva, los biopolímeros de la invención pueden ser capaces de incluir múltiples funcionalidades simultáneamente en un único biopolímero que puede tener ventajas obvias debido a la biocompatibilidad del mismo.

En este sentido, el primer aspecto de la presente invención es un biopolímero que comprende las secuencias aminoácidas A, B y C con la estructura:

$$(A_n - B_m)_s - C_p,$$

donde,

A tiene la estructura  $(D_{t1}-E_{v1}-D_{t2})$  o la estructura  $(D_{t1}-E_{v2})$ , donde D es SEQ ID NO: 1; E es SEQ ID NO: 2;  $t1$  y  $t2$  tienen valores de entre 2 y 4;  $v1$  y  $v2$  tienen valores de entre 1 y 5,

B se selecciona de la lista que comprende SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 4 o SEQ ID NO: 26. B también puede ser la secuencia SEQ ID NO: 27.

C tiene la estructura  $(G_{w1}-H_{x1}-G_{w2})$  O  $H_{x2}$ , donde G es SEQ ID NO: 5; H es una secuencia aminoácida que comprende un péptido que se selecciona de la lista que comprende RGD, LDT, SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 9 o SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 11, SEQ ID NO: 12, SEQ ID NO: 13, SEQ ID NO: 14, SEQ ID NO: 15 o SEQ ID NO: 16;  $w1$  y  $w2$  tienen valores de entre 5 y 15;  $x1$  y  $x2$  tienen valores de entre 1 y 5,

$n$  tiene un valor de entre 5 y 15,

$m$  tiene un valor de entre 10 y 70,

$s$  tiene un valor de entre 2 y 4, y

$p$  tiene un valor de entre 1 y 5.

La secuencia aminoácida A es el bloque hidrofóbico, la secuencia aminoácida B es el bloque hidrofílico y la secuencia aminoácida C es el bloque bioactivo. Este último bloque comprende dominios que son capaces de reconocer secuencias específicas e interaccionar con ellas de modo que permiten la proximidad del biopolímero de la invención a la diana celular deseada.

$t1$  y  $t2$  pueden tener valores iguales o diferentes.  $v1$  y  $v2$  pueden tener valores iguales o diferentes.  $w1$  y  $w2$  pueden tener valores iguales o diferentes.  $x1$  y  $x2$  pueden tener valores iguales o diferentes.

La secuencia RGD es reconocida por diversos tipos celulares, la secuencia SEQ ID NO: 7 es reconocida por células endoteliales, LDT, SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 9 está presente en laminina y es reconocida por diversos tipos celulares, SEQ ID NO: 10 es reconocida por neuritas, es decir, cualquier expansión del soma de una neurona,

## ES 2 344 097 B1

ya sea una dendrita o un axón. Estas secuencias, que forman parte del biopolímero de la invención, son reconocidas por sus respectivos tipos celulares y propician su unión. Los biopolímeros que contengan SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 9 o SEQ ID NO: 10 se pueden emplear en terapias de daños vasculares, tejidos nerviosos o de médula espinal respectivamente.

5 La secuencia SEQ ID NO: 11 tiene afinidad por fosfato de calcio, SEQ ID NO: 12 tiene afinidad por el oro, SEQ ID NO: 13 tiene afinidad por la plata, SEQ ID NO: 14 tiene afinidad por el platino, SEQ ID NO: 15 tiene afinidad por el silicio (SiO<sub>2</sub>), SEQ ID NO: 16 tiene afinidad por el carbonato cálcico (CaCO<sub>3</sub>). Estas secuencias permiten la integración en el biopolímero de capacidades como, unión a la parte mineral del hueso, introducción de elementos de  
10 detección, capacidad bactericida y otras.

La secuencia aminoacídica H puede comprender un péptido que pertenezca a una secuencia de un factor de crecimiento, una secuencia inductora de nucleación inorgánica, una secuencia antiadherente como por ejemplo, pero sin limitarse, SEQ ID NO: 1. La secuencia H puede codificar para un agente activo o agente terapéutico o agente  
15 quimioterapéutico o un anticuerpo terapéutico o un fragmento de anticuerpo terapéutico.

Un factor de crecimiento es una sustancia, normalmente de naturaleza proteica, pero sin limitarse. La función principal de un factor de crecimiento es estimular la proliferación celular, entre otras funciones. La secuencia del factor de crecimiento se selecciona de la lista que comprende los factores; factor de crecimiento transformante beta  
20 TGF-beta (para la regeneración de hueso), factor de crecimiento de los fibroblastos FGF o KGF, factor de crecimiento epidérmico EGF o TGF-alfa, factor de crecimiento endotelial vascular VEGF, factor de tipo insulina ILGF, factor como BMPs para hueso o factor TGF-β de la familia *Sonic hedgehog gene*.

La secuencia inductora de la nucleación inorgánica es un péptido que tiene la función, pero sin limitarse, de promover de forma activa y eficaz la nucleación y crecimiento de cristales inorgánicos en condiciones en las que éstos no aparecerían o aparecerían con otra estructura en ausencia de esta secuencia.  
25

La secuencia antiadherente es una secuencia peptídica que inhibe la interacción específica entre el biopolímero que la contiene y al menos un tipo celular.  
30

En este sentido, los biopolímeros de la presente invención presentan una gelificación que en algunos casos es instantánea y en todos muy corta; de entre 1 y 12 minutos para el biopolímero A y 21 minutos para el biopolímero B. Este tiempo es mucho menor al de los biopolímeros descritos en el estado de la técnica que suele ser de varias horas, en los que se aumenta la viscosidad y se lleva a cabo un entrecruzamiento covalente *in situ* para que alcancen propiedades mecánicas robustas y de mayor estabilidad. De esta manera no existe dilución apreciable del implante en el entorno biológico como ocurre con los sistemas exclusivamente entrecruzables. Y además se alcanzan propiedades mecánicas con valores de módulos en compresión del orden de 10<sup>5</sup> Pa (tanto para el biopolímero A como para el biopolímero B) y por tanto no es necesario recurrir a estrategias combinadas que tienen el inconveniente de presentar un aumento de los tiempos necesarios para alcanzar las propiedades óptimas así como la introducción de otros agentes que pueden afectar a la biocompatibilidad del implante.  
35  
40

Una realización preferida de la invención se refiere al biopolímero donde A tiene la estructura (D<sub>11</sub>-E<sub>v1</sub>-D<sub>12</sub>)- En otra realización preferida del biopolímero, C tiene la estructura (G<sub>w1</sub>-H<sub>x1</sub>-G<sub>w2</sub>). Según otra realización preferida del biopolímero, la secuencia aminoacídica de H contiene el péptido RGD. En otra realización preferida del biopolímero, la secuencia aminoacídica de H que contiene el péptido RGD es SEQ ID NO: 6.  
45

En otra realización preferida, la secuencia aminoacídica B es SEQ ID NO: 3.

Según una realización aún más preferida del biopolímero, m tiene un valor de entre 55 y 65. Una realización más preferida es el biopolímero que comprende los péptidos B, E, G, D y H con la estructura [(D<sub>2</sub>-E-D<sub>2</sub>)<sub>10</sub>-B<sub>60</sub>]<sub>2</sub>-(G<sub>10</sub>-H-G<sub>10</sub>)<sub>2</sub>.  
50

Otra realización preferida se refiere al biopolímero donde la secuencia aminoacídica B es SEQ ID NO: 4. Según una realización más preferida del biopolímero, m tiene un valor de entre 15 y 25. Otra realización aún más preferida se refiere al biopolímero que comprende los péptidos B, E, G, D y H con la estructura [(D<sub>2</sub>-E-D<sub>2</sub>)<sub>10</sub>-B<sub>20</sub>]<sub>2</sub>-(G<sub>10</sub>-H-G<sub>10</sub>)<sub>2</sub>. El péptido resultante de intercalar un aminoácido Valina (V) entre los aminoácidos Glicina (G) y Alanina (A) de la secuencia SEQ ID NO: 4 actúa como diana de proteasas y modula la biodegradabilidad del biopolímero y es muy adecuado por ejemplo para la liberación de fármacos o medicina regenerativa.  
55

Con el fin de introducir las funcionalidades que se necesita para cada aplicación, los biopolímeros proteicos recombinantes tipo elastina se diseñan y construyen a medida mediante la conjunción de diferentes péptidos que contengan dominios que se introducen para incluir cada una de las características requeridas. Así pues, los dominios son:  
60

- Dominios con funciones biomiméticas. Se incluyen aquellos dominios capaces de introducir funciones de autoensamblado y autoorganización en la nano y microescala, necesarios para inducir un cambio en sus propiedades físicas muy acusado al aumentar la temperatura. Esta característica del biopolímero se denomina Gelación Térmica Inversa (*Reverse Thermal Gelation*, RTG). Las soluciones acuosas de estos biopolímeros tienen baja viscosidad a temperatura ambiente y exhiben una mayor viscosidad con el aumento de la temperatura, llegando  
65

## ES 2 344 097 B1

a formar un gel semisólido o sólido cuando alcanzan la temperatura fisiológica (entorno a los 37°C). Dicha característica además de ser la responsable de la autogelificación permite la utilización de estos biopolímeros como sistemas de dosificación de fármacos ya que el mismo proceso de gelificación va a servir para encapsular fármacos y principios activos presentes en la disolución que posteriormente se pueden liberar de forma controlada. Otro tipo de aplicación sería el de aumento de volumen de tejido.

- Dominio no bioactivo tipo elastina. Su función es dotar al material de la adecuada biocompatibilidad y propiedades mecánicas. Un biopolímero que sólo incluyera este tipo de secuencias sin incluir secuencias bioactivas podría diseñarse además como sistema antiadherente para aplicaciones como la prevención de adherencias.
- Dominios bioactivos. Estos dominios dotan al biopolímero de propiedades específicas de adhesión celular a través de péptidos conocidos de las proteínas de la matriz extracelular. Como se ha indicado anteriormente, entre secuencias con dominios de este tipo están SEQ ID NO: 7 que es reconocida por las células endoteliales, LDT, SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 9 procede de la laminina o SEQ ID NO: 10 que es reconocida por neuritas.
- Otros dominios para inducir la biodegradabilidad del biopolímero, muy adecuado para que se produzca una liberación controlada de fármacos.

En adelante, se hará referencia a cualquiera de los biopolímeros anteriores como “biopolímeros de la invención” o “biopolímeros de la presente invención”.

Las secuencias aminoacídicas (se puede usar el término “péptidos” indistintamente para referirse a las secuencias aminoacídicas) B, D, E, G y H de acuerdo con las estructuras descritas que dan lugar a los biopolímeros de la invención, pueden estar unidos por enlace covalente o cualquier otro tipo de enlace que de lugar a una estructura que mantenga las propiedades de los biopolímeros de la presente invención. El enlace se selecciona, aunque sin limitarse, de la lista que comprende puentes de hidrógeno, apareamiento iónico, asociación hidrofóbica o formación de complejos de inclusión.

Otro aspecto de la presente invención se refiere a un ácido nucleico que comprende una secuencia nucleotídica que codifica para la secuencia aminoacídica de cualquier biopolímero de la invención.

El ácido nucleico (en adelante, ácido nucleico de la invención o ácido nucleico de la presente invención) incluye secuencias de ácido nucleico cuyo producto de la transcripción, el ARN mensajero (ARNm) codifica para la misma secuencia de aminoácidos (en adelante, secuencia de aminoácidos de la presente invención o secuencia de aminoácidos de la invención). También se incluyen secuencias variantes degeneradas de las secuencias nucleotídicas de la invención, cuyo producto es un biopolímero con las mismas características que el biopolímero de la invención. También se incluyen secuencias de nucleótidos que codifiquen para secuencias aminoacídicas que tengan modificaciones en su extremo N-terminal, C-terminal y/o en alguna posición aminoacídica interna de modo que la función del biopolímero resultante sea la misma que la que resulta de la traducción de la secuencia de ARNm transcrita a partir de la secuencia de nucleótidos de la invención. La secuencia de aminoácidos puede estar codificada por cualquier secuencia nucleotídica que de lugar a cualquiera de las secuencias de aminoácidos de la invención. Debido a que el código genético es degenerado, un mismo aminoácido puede ser codificado por diferentes codones (tripletes), por ello, la misma secuencia de aminoácidos puede ser codificada por distintas secuencias de nucleótidos.

El ácido nucleico de la presente invención puede tener unido a su extremo 5' una secuencia nucleotídica que sirva de secuencia iniciadora de la transcripción. La secuencia puede ser, pero sin limitarse, la secuencia nucleotídica SEQ ID NO: 20. Asimismo, el ácido nucleico de la presente invención puede tener unido a su extremo 3' una secuencia de terminación de la transcripción como por ejemplo, pero sin limitarse, la secuencia GTATGA.

Un aspecto más de la presente invención se refiere a un vector de expresión que comprende el ácido nucleico de la invención.

El término “vector de expresión” (en adelante, vector de la invención o vector de la presente invención) se refiere a un fragmento de ADN que tiene la capacidad de replicarse en un determinado huésped y, como el término indica, puede servir de vehículo para multiplicar otro fragmento de ADN que haya sido fusionado al mismo (inserto). Inserto se refiere a un fragmento de ADN que se fusiona al vector; en el caso de la presente invención, el vector puede comprender cualquiera de las secuencias nucleotídicas que codifican para cualquiera de los biopolímeros de la invención, fusionadas al mismo, que puede replicarse en el huésped adecuado. Los vectores pueden ser plásmidos, cósmidos, bacteriófagos o vectores virales, sin excluir otro tipo de vectores que se correspondan con la definición realizada de vector.

Otro aspecto de la presente invención se refiere a una célula aislada transfectada con el vector de la invención. En adelante, se hará referencia a las células anteriores como las células de la invención o las células de la presente invención.

El término “célula” tal como se entiende en la presente invención hace referencia a una célula procariótica o eucariótica. La célula puede ser una bacteria capaz de replicar un ADN ajeno transformado como por ejemplo cualquiera de las cepas de la especie *Escherichia coli* o una bacteria capaz de transferir el ADN de interés al interior de una planta como por ejemplo *Agrobacterium tumefaciens*. Preferiblemente, la célula hace referencia a una célula eucariótica vegetal y dentro de este grupo, más preferiblemente, a aquellas células pertenecientes al reino *Plantae*. Así

## ES 2 344 097 B1

pues, en el caso de que la célula sea vegetal, el término célula comprende, al menos, una célula del parénquima, célula meristemática o de cualquier tipo, diferenciada o indiferenciada. Asimismo, también se incluye en esta definición un protoplasto (célula de una planta que carece de pared celular).

5 El término “transfección” hace referencia a la introducción de material genético externo en células mediante plásmidos, vectores víricos (en este caso también se habla de transducción) u otras herramientas para la transferencia. El término transfección para métodos no-virales es usado en referencia a células eucarióticas de mamífero, mientras que el término transformación se prefiere para describir las transferencias no-virales de material genético en bacterias y células eucariotas no animales como hongos, algas o plantas.

10 Otro aspecto de la presente invención se refiere al uso del biopolímero de la invención para preparar la preparación de un implante. El término “implante” tal como se entiende en la presente invención es una sustancia en estado sólido o semi-sólido que puede colocarse en el cuerpo para mejorar alguna de sus funciones, o con fines estéticos.

15 Otro aspecto de la presente invención es un implante que comprende cualquiera de los biopolímeros de la invención. Una realización preferida de la presente invención es un implante donde el biopolímero tiene una concentración de entre 30 y 300 mg/ml. Preferiblemente el implante tiene una concentración de biopolímero de entre 50 y 200 mg/ml. Otra realización preferida de la invención es un implante que se presenta en una forma adaptada a la administración parenteral. La forma adaptada a la administración parenteral se refiere a un estado físico que pueda permitir su administración inyectable, es decir, preferiblemente en estado líquido, y para ello se requiere que el biopolímero esté a una temperatura inferior a su temperatura de gelificación. La administración parenteral puede ser por vía de administración intramuscular, intradérmica, subcutánea o intraósea pero sin limitarse únicamente a estos tipos de vías de administración parenteral. Otra posibilidad es que el implante se presente en una forma adaptada a la administración seleccionada del grupo que comprende, pero sin limitarse, oral, rectal, bucal, tópica, nasal, oftálmica, subcutánea, intramuscular, intravenosa, transdérmica, intratecal, intra-articular, intra-arterial, sub-aracnoideo, bronquial, linfática, vaginal o intrauterina.

25 Según otra realización preferida, el implante incluye además una sustancia activa. Preferiblemente la citada sustancia activa es una sustancia farmacéuticamente aceptable usada para prevención, diagnóstico, alivio, tratamiento o curación de enfermedades en animales. Preferiblemente el animal es un mamífero. Preferiblemente el mamífero es un humano. El implante puede mezclarse con células de uno o varios tipos, previamente a la implantación del mismo.

En adelante se hará referencia al implante como el implante de la invención o el implante de la presente invención.

35 Otro aspecto de la presente invención se refiere al uso del implante de la invención para el tratamiento de cartílago o hueso. Mediante el uso del implante pueden tratarse defectos que no sean dañinos. El tratamiento puede ser preventivo de daños o simplemente como mejora de un estado que no implique un daño. El implante es capaz de reparar un daño en el cartílago o hueso o de mantener unidas estructuras cartilaginosas u óseas fragmentadas a cualquier nivel, macroscópico o microscópico así como permitir la liberación de sustancias activas farmacéuticamente aceptables que ayuden al tratamiento del dolor o a la recuperación de los daños.

40 Un aspecto más de la presente invención es el uso del implante de la invención para el tratamiento del tejido nervioso o médula espinal. Mediante el uso del implante pueden tratarse defectos que no sean dañinos. El tratamiento puede ser preventivo de daños o simplemente como mejora de un estado que no implique un daño. El implante es capaz de permitir la liberación de sustancias activas farmacéuticamente aceptables que ayuden al tratamiento del dolor o a la recuperación de un daño en el tejido nervioso o médula espinal. Para llevar a cabo este tipo de tratamiento, el biopolímero puede contener la secuencia SEQ ID NO: 10 con células incorporadas. Las células incorporadas pueden ser células madre, mesenquimales, o cualquier célula diferenciada.

50 Otro aspecto de la presente invención es el uso del implante para el tratamiento de necrosaciones de varices. El biopolímero de la invención actúa taponando varices y causando su necrosación. El implante puede contener agentes farmacológicos.

55 Un aspecto más de la presente invención se refiere a un vehículo farmacéuticamente aceptable que comprende cualquiera de los biopolímeros de la invención.

60 Tal como se entiende en la presente invención, un “vehículo farmacéuticamente aceptable” se refiere a aquellas sustancias, o combinación de sustancias, conocidas en el sector farmacéutico, utilizadas en la elaboración de formas farmacéuticas de administración e incluye sólidos o líquidos, disolventes, tensioactivos, etc. El vehículo farmacéuticamente aceptable de la presente invención permite una dosificación o administración específica y dirigida además de dar consistencia y forma a la preparación farmacéutica. Además, el vehículo debe ser farmacéuticamente adecuado, es decir, que permita la actividad del biopolímero de la invención.

65 Una realización preferida es el vehículo farmacéuticamente aceptable donde el biopolímero de la invención tiene una concentración de entre 30 y 300 mg/ml. Preferiblemente el vehículo tiene una concentración de biopolímero de entre 50 y 200 mg/ml. Según otra realización preferida el vehículo farmacéuticamente aceptable se presenta en una forma adaptada a la administración parenteral. Además, el tipo de administración se puede seleccionar de entre los que se han citado en un apartado anterior.

En adelante se hará referencia al vehículo farmacéuticamente aceptable como el vehículo de la invención o vehículo de la presente invención.

Otro aspecto de la presente invención se refiere al uso del vehículo de la invención para la liberación controlada de fármacos. El vehículo es capaz de dosificar un fármaco de una manera sostenida y/o localizada en un tejido o entorno de células específico. El vehículo de la presente invención puede comprender una sustancia activa. Tal como se ha descrito en la presente invención el biopolímero comprendido en el vehículo de la invención puede tener secuencias de reconocimiento celular que proporcionan una localización específica. El vehículo de la invención puede ser, pero sin limitarse, del tipo nanopartícula, micropartícula, microesfera o microcápsula. El uso del vehículo de la invención para la liberación controlada de fármacos se puede llevar a cabo en animales. Preferiblemente los animales son mamíferos. Preferiblemente los mamíferos son humanos.

El vehículo de la presente invención capaz de liberar fármacos de forma controlada, puede emplearse, pero sin limitarse, para el tratamiento de varices.

Otro aspecto de la presente invención se refiere a un método para la síntesis del biopolímero de la invención que comprende:

- a. insertar el ácido nucleico de la invención en un vector de expresión,
- b. transfectar una célula con el vector de expresión obtenido según el apartado (a),
- c. seleccionar la célula transfectada según el apartado (b) que comprende el ácido nucleico de la invención,
- d. expresar el ácido nucleico en la célula según el apartado (c) y
- e. purificar el biopolímero producido según el apartado (d).

El grado de complejidad composicional impuesto por las necesidades del diseño multifuncional no puede ser alcanzado por técnicas estándar de síntesis macromolecular. El biopolímero se obtiene como proteína recombinante, mediante técnicas adaptadas de biología molecular y biotecnológica, en microorganismos o plantas modificados genéticamente.

La secuencia nucleotídica que codifica para la secuencia aminoacídica del biopolímero de la presente invención, se inserta en un vector de expresión definido anteriormente.

La transfección de una célula, definida en un párrafo anterior, se lleva a cabo con técnicas conocidas en el estado de la técnica, por ejemplo pero sin limitarse, con electroporación, con biolística, *Agrobacterium tumefaciens* o cualquier otra técnica que permita la integración de cualquiera de los ácidos nucleicos de la invención en el ADN de la célula huésped, ya sea genómico, cloroplástico o mitocondrial.

La expresión del ácido nucleico en la célula de la invención da lugar a un biopolímero que puede ser purificado mediante técnicas conocidas en el estado de la técnica.

A lo largo de la descripción y las reivindicaciones la palabra “comprende” y sus variantes no pretenden excluir otras características técnicas, aditivos, componentes o pasos. Para los expertos en la materia, otros objetos, ventajas y características de la invención se desprenderán en parte de la descripción y en parte de la práctica de la invención. Las siguientes figuras y ejemplos se proporcionan a modo de ilustración, y no se pretende que sean limitativos de la presente invención.

### Descripción de las figuras

Fig. 1. Muestra la electroforesis SDS-PAGE del biopolímero A.

Fig. 2. Muestra la dependencia de las propiedades reológicas del polímero con la temperatura para una muestra del biopolímero A en PBS y para una concentración de 200 mg/ml.

En el eje de ordenadas izquierdo se muestran los valores correspondientes a  $G'$  (círculos blancos) y en el eje derecho los valores correspondientes a  $G''$  (círculos negros), los valores están en Pascales (Pa).

La escala Delta hace referencia al ángulo de desfase, medido en grados.

En el eje de abcisas se muestra la temperatura (T) en °C.

Fig. 3. Muestra la variación de las propiedades reológicas a 37°C para una muestra del biopolímero A en PBS y para una concentración de 200 mg/ml.



## ES 2 344 097 B1

En el eje de ordenadas izquierdo se muestran los valores correspondientes a  $G'$  (círculos blancos) y en el eje derecho los valores correspondientes a  $G''$  (círculos negros), los valores están en Pascales (Pa).

La escala Delta hace referencia al ángulo de desfase, medido en grados.

En el eje de abcisas se muestra el tiempo (t) en minutos.

Fig. 4. Muestra la electroforesis SDS-PAGE del biopolímero B.

Fig. 5. Muestra la dependencia de las propiedades reológicas del polímero con la temperatura para una muestra del biopolímero B en PBS y para una concentración de 200 mg/ml.

En el eje de ordenadas izquierdo se muestran los valores correspondientes a  $G'$  (círculos blancos) y en el eje derecho los valores correspondientes a  $G''$  (círculos negros), los valores están en Pascales (Pa).

La escala Delta hace referencia al ángulo de desfase, medido en grados.

En el eje de abcisas se muestra la temperatura (T) en °C.

Fig. 6. Muestra la variación de las propiedades reológicas a 37°C para una muestra del biopolímero B en PBS y para una concentración de 200 mg/ml.

En el eje de ordenadas izquierdo se muestran los valores correspondientes a  $G'$  (círculos blancos) y en el eje derecho los valores correspondientes a  $G''$  (círculos negros), los valores están en Pascales (Pa).

La escala Delta hace referencia al ángulo de desfase, medido en grados.

En el eje de abcisas se muestra el tiempo (t) en minutos.

Fig. 7. Muestra los biopolímeros de la invención disueltos en PBS por debajo (4°C) y por encima (37°C) de su temperatura de transición.

### Ejemplos

A continuación se ilustrará la invención mediante unos ensayos realizados por los inventores que describen la síntesis del biopolímero de la presente invención así como sus características reológicas. Los ejemplos se proporcionan para poder comprender la descripción, y no se pretende que sean limitativos de la presente invención.

#### Ejemplo 1

##### *Obtención de polímeros proteicos recombinantes tipo elastina*

##### *1.1 Diseño y obtención de la secuencia nucleotídica sintética que codifica la secuencia aminoacídica del biopolímero de la invención*

Desde el diseño del gen se tuvo que intentar obviar la contradicción existente entre el uso de los codones más frecuentes y oportunos que identifiquen aminoácidos muy repetidos y la necesidad de no sobrecargar o incluso, empobrecer hasta el colapso el sistema de traducción celular. Si se usan sistemas heterólogos procariontes, se debe considerar el problema derivado del limitado uso que hacen del código genético y que varía con la especie. También se consideró el problema que reside en la creación de un gen que está formado por una larga secuencia codificante por múltiples y/o pequeños fragmentos artificiales. Por último se debe soslayar la alta frecuencia de recombinación que suele ocurrir cuando el ADN exógeno contiene repeticiones de dominios con alta semejanza.

Esta etapa incluye la utilización de sintetizadores automáticos de ADN junto con técnicas de ADN recombinante. La obtención de polímeros con múltiples repeticiones pasa por la obtención del gen que lo codifica, que según sea la longitud de la secuencia puede hacer necesaria la síntesis previa de un monómero polinucleotídico que se pueda interconectar linealmente y en la dirección correcta.

La obtención de la cantidad suficiente del gen monomérico con la secuencia correcta para producir las secuencias nucleotídicas repetitivas que codifiquen los distintos polipéptidos ha requerido el cultivo de los clones adecuados y de la digestión de sus plásmidos. De esta forma se generó fácilmente la gran cantidad de monómero necesaria para la reacción de ligación controlada, concatenación o concatenamerización.

Aunque este tipo de estrategia parezca ser más dispendiosa en términos de tiempo, la síntesis *in vivo* garantiza la producción de la secuencia correcta en gran cantidad y además ofrece ulteriores ventajas: permite controlar el gen monomérico antes de la oligomerización, posibilita ulteriores modificaciones de la secuencia sea por mutagénesis dirigida sea por la creación de co-polímeros antes de la oligomerización.

La polimerización de las secuencias nucleotídicas monoméricas se puede llevar a cabo, pero sin limitarse, por medio de la concatenación, es decir, la ligación aleatoria de las piezas monoméricas; por medio del método iterativo y recursivo, una técnica de preparación paso a paso de oligómeros desde monómeros; o por medio del método de clonaje *Seamless* que se trata de un método de clonaje sin costuras, definición que se refiere a la posibilidad de elegir una secuencia específica que se traduzca en el deseado aminoácido en el punto de corte.

La concatenación permite sintetizar polímeros de oligómeros mediante la unión lineal unidireccional, cabeza-cola, de los segmentos de ADN que forman el monómero, esta unión solo es posible si los extremos de los segmentos son de hebra única, protuberantes y cohesivos entre ellos pero no consigo mismos. De esta forma el extremo a una hebra de la cabeza del monómero será complementario y se hibridará exclusivamente con el extremo de cola de otro monómero idéntico. Estos extremos, por tanto, no pueden ser palindrómicos, como corrientemente ocurre cuando son generados por las endonucleasas de restricción empleadas rutinariamente en ingeniería genética, donde el sitio de reconocimiento y corte coinciden secuencialmente, sino que deben ser diferentes.

Se han ido desarrollando distintas modificaciones a la técnica de la concatenación adaptándose a las exigencias específicas. Los monómeros con extremos cohesivos de única hebra se han obtenido por hibridación de oligómeros, por unión de oligonucleótidos cortos (linkers) o también por digestión con endonucleasas específicas.

El método iterativo y recursivo es una técnica de preparación paso a paso de oligómeros desde monómeros, que permite controlar tanto el orden de adición como el número de bloques que se unirán en cada etapa de su crecimiento, permitiendo confeccionar polímeros *ad hoc*. Para realizar tal método es necesario crear unas secuencias en las extremidades del segmento que codifiquen el monómero proteico que sean reconocidas por dos diferentes endonucleasas y cuyos cortes produzcan extremidades complementarias pero no palindrómicas. Esta secuencia monomérica es clonada en un plásmido que sirve de vector de amplificación génica y que proporciona tanto el siguiente vector de clonaje cuando se digiere con un único enzima; como el inserto de la clonación cortando con ambos enzimas.

El método de clonaje *Seamless* independiza el diseño de la secuencia del inserto que codifica el monómero de las secuencias reconocidas por las endonucleasas que lo generan. Esta estrategia es posible por la existencia de un restringido número de enzimas de restricción de tipo IIs que reconocen una secuencia específica no palindrómica que no coincide con el sitio de corte. Esta característica peculiar elimina los inconvenientes de la necesidad de incluir secuencias extrañas al polímero para permitir la generación de extremos cohesivos que permitan la concatenación y además con una única digestión se logran fragmentos que se unen de forma uni-direccional.

### 1.2. Expresión y purificación del polímero

Una vez creada la secuencia nucleotídica que codificaba el biopolímero completo se pasó a la expresión del mismo. Para ello se transfirió la secuencia nucleotídica desde el correspondiente vector de clonación al vector especializado en su expresión mediante el uso de enzimas de restricción convencionales. Una vez comprobada que la transferencia se ha producido correctamente se transformó una cepa bacteriana específica para la expresión de dicha secuencia mediante cualquiera de las técnicas válidas que forman parte del conocimiento general común.

La expresión de los polipéptidos recombinantes se inició inoculando una colonia aislada que contenía el vector recombinante correspondiente en medio líquido LB con el eventual antibiótico de resistencia de la cepa y el antibiótico de resistencia adquirida con el vector de expresión.

Se incubó el cultivo bacteriano a 37°C, con agitación orbital a 250 rpm, durante 11 horas aproximadamente, se utilizó este caldo de cultivo como inóculo de un medio fresco en una relación de 1/30. El volumen de medio en los Erlenmeyers no superó el 20-25% de su capacidad para favorecer una buena oxigenación del cultivo y se continuó el crecimiento de las bacterias en las mismas condiciones hasta que la densidad óptica a 600 nm estaba en torno a 0,6. En ese momento se indujo la expresión del biopolímero recombinante añadiendo IPTG a una concentración final de 1 mM, y se volvió a incubar el cultivo a la temperatura adecuada y durante el tiempo requerido en cada ensayo.

Una vez terminada la inducción, se inhibió el crecimiento y el metabolismo de las bacterias enfriándolas a 4°C. Posteriormente, se sedimentaron las células centrifugando a 5000xg durante 10 minutos a 4°C, se decantó el sobrenadante y se secaron las paredes de los tubos de centrifuga para retirar los restos de medio de cultivo.

Se lavó el cultivo sedimentado con 100 mL/L de cultivo en tampón salino TBS (Tris-base 20 mM, NaCl 150 mM pH=8) resuspendiendo las bacterias mediante agitación fuerte y/o pipeteo, y se volvió a centrifugar a 5000xg durante 10 minutos a 4°C. A continuación se decantó el sobrenadante, y se resuspendió el sedimento con 25 mL/L de cultivo con la solución TE (Tris-base 20 mM, EDTA 1 mM pH=8) mediante agitación fuerte y/o pipeteo. Se mantuvo a 4°C y se le añadió 10 µg/mL del inhibidor de proteasa PMSF.

Las bacterias se lisaron sonicando con un aparato Sonicator 3000 de Misonix (*New York*) se realizaron 6 ciclos de 3,5 minutos con pulsos de 2 segundos cada 5 segundos a unos 100 W de potencia. Durante este proceso, la muestra se mantuvo en hielo para evitar la desnaturalización y precipitación por calor de las proteínas. Por último, se centrifugó a 15000xg durante 60 minutos a 4°C: el sobrenadante constituye la fracción soluble total, y el sedimento, la fracción insoluble total. La fracción soluble total de las bacterias se acidificó hasta un pH=3,5 con ácido clorhídrico diluido en agua manteniendo la muestra en hielo y en agitación. A continuación, el material precipitado (fundamentalmente

## ES 2 344 097 B1

proteínas ácidas y ADN) se retiró por centrifugación a 15000xg durante 20 minutos a 4°C. Según el polímero en cuestión se modificó o no la concentración salina y el valor de pH del sobrenadante.

La purificación de los polímeros se realizó aprovechando la naturaleza inteligente de los polímeros tipo elastina, y su transición inversa. La purificación de los polímeros recombinantes a partir de la fracción soluble de *E. coli* consta de etapas sucesivas de calentamiento-precipitación y enfriamiento-resuspensión. La precipitación selectiva se realizó mediante el calentamiento de la muestra a 70°C durante dos horas. A continuación se separó el precipitado centrifugando a 15000xg durante 20 minutos a 40°C y se solubilizó el precipitado a 2 mL/L de agua tipo I a 4°C en agitación durante 12 horas. Se repitió la operación dos veces más. Tras la última solubilización, el polímero disuelto se dializó frente a agua de tipo I a 4°C, posteriormente se liofilizó y se conservó a -20°C.

### Ejemplo 2

#### *Obtención de biopolímeros proteicos recombinantes tipo elastina A*

Como primer ejemplo se describe un copolímero tipo elastina A con capacidad de autoensamblarse por contener bloques alternantes con carácter hidrofóbicos e hidrofílicos de forma que al superar su temperatura de transición inversa cambian drásticamente sus propiedades mecánicas. En este caso los bloques hidrofóbicos corresponden con péptidos tipo B donde la secuencia aminoacídica es SEQ ID NO: 3 y los hidrofílicos a péptidos tipo [(D)<sub>2</sub>(E)(D)<sub>2</sub>]. Además, la secuencia aminoacídica C incluye una secuencia bioactiva RGD no específica. Es decir, el biopolímero de este ejemplo tiene la estructura: [(D<sub>2</sub>-E-D<sub>2</sub>)<sub>10</sub>-B<sub>60</sub>]<sub>2</sub>-(G<sub>10</sub>-H-G<sub>10</sub>)<sub>2</sub>.

#### *2.1. Síntesis de la secuencia nucleotídica sintética que codifica el biopolímero A*

La síntesis del polímero se realizó tal como se ha descrito en el ejemplo 1. Para sintetizar el bloque hidrofílico de 25 aminoácidos (D<sub>2</sub>-E-D<sub>2</sub>) se generó una secuencia nucleotídica artificial por hibridación de dos oligonucleóticos complementarios con la secuencia SEQ ID NO: 17.

Con el objeto de que la secuencia monomérica anterior pudiera concatenarse para formar la secuencia completa, se situaron convenientemente en los extremos del mismo sendas secuencias de reconocimiento de enzimas de restricción que, al ser utilizadas, dejarán como extremos cohesivos únicamente el codón GTA codificante para el aminoácido Valina. De esta forma se pueden formar cadenas del monómero sin saltos en su marco de lectura y sin la incorporación de codones ajenos a la secuencia deseada.

Siguiendo la técnica de concatenación se obtuvo una secuencia nucleotídica formada por 10 repeticiones de la secuencia inicial, con una longitud de zona codificante de 750 pares de bases y flanqueado también por las secuencias de restricción y sendos codones GTA de enlace.

En la síntesis del bloque hidrofóbico se partió de un fragmento de mayor tamaño pero que también fue sintetizado a partir de oligonucleótidos de síntesis química. En este caso el monómero peptídico tenía la estructura (B)<sub>20</sub> donde B es SEQ ID NO: 3, codificado por la secuencia nucleotídica SEQ ID NO: 18.

También esta vez se usaron las mismas enzimas de restricción y por tanto las mismas secuencias flanqueantes del gen codificante, si bien en este caso se utilizó la técnica recursiva iterativa para repetir tres veces el gen descrito y formar un gen de 900 pares de bases que codifica 60 repeticiones del pentabloque tipo B.

La secuencia nucleotídica del bloque hidrofílico descrito (D<sub>2</sub>-E-D<sub>2</sub>)<sub>10</sub> y el correspondiente al bloque hidrofóbico (B)<sub>60</sub> donde B es SEQ ID NO: 3, se fusionaron utilizando las secuencias de restricción citadas situando en el extremo 5' el gen que codifica para el bloque hidrofílico. Posteriormente la secuencia resultante, con una longitud de 1650 pares de bases, se duplicó por la técnica recursiva dando lugar a la secuencia de 3300 pares de bases que codifica el polipéptido (D<sub>2</sub>-E-D<sub>2</sub>)<sub>10</sub>-(B)<sub>60</sub>.

La incorporación de la secuencia bioactiva se realizó por la misma técnica descrita.

En este caso, la secuencia que codifica la estructura (G<sub>10</sub>-H-G<sub>10</sub>) es SEQ ID NO: 19.

En este caso, también se duplicó el fragmento por las mismas técnicas descritas antes de unirlo al tetrabloque de 1650 pares de bases. El producto de la duplicación tenía una longitud de 672 pares de bases codificando un polipéptido de 224 aminoácidos. La incorporación del fragmento con las dos secuencias bioactivas RGD al extremo 3' del fragmento de 3330 pares de bases se realizó por la técnica iterativa recursiva usando las enzimas de restricción ya mencionadas.

Como resultado de la incorporación de los fragmentos se obtuvo una secuencia de 3972 pares de bases que codifica el polipéptido abreviado:



## ES 2 344 097 B1

Esta secuencia se incorporó a un vector de expresión previamente modificado para aceptar fragmentos procedentes de la digestión con las enzimas de restricción adecuadas descritas incorporando la secuencia nucleotídica SEQ ID NO: 20 en el extremo 5' del fragmento de 3972 pares de bases y la secuencia GTATGA en el extremo 3' del mismo. El plásmido resultante comprende una secuencia nucleotídica con un marco abierto de lectura de 3996 pares de bases, SEQ ID NO: 21, que codifica para 1331 aminoácidos, SEQ ID NO: 22.

### 2.2 Expresión del biopolímero A recombinante

El vector de expresión se usó para transformar una cepa de *Escherichia coli* adecuada a la expresión de genes exógenos seleccionando las colonias transformantes mediante el apropiado antibiótico.

Se usó una de las colonias resultantes de la transformación para inocular un volumen de medio LB con el mismo antibiótico y un 1% de glucosa. Tras la incubación a 37°C con agitación orbital a 250 rpm durante toda la noche, el cultivo bacteriano se utilizó para inocular un volumen 100 veces superior de medio TB con el mismo antibiótico utilizado y una concentración de 0,8% (v/v) de glicerol, un 0,2% (p/v) de alfa-lactosa y un 0,05% (p/v) de glucosa.

Tras incubación en las mismas condiciones anteriores se aislaron por centrifugación las células resultantes y se sometieron a dos lavados con tampón salino. Posteriormente se resuspendieron en tampón con EDTA y se añadió PMSF en una concentración final de 1 mM. La suspensión celular se rompieron por sonicación manteniendo su temperatura a 4°C y el extracto se centrifugó para retirar los restos bacterianos.

El sobrenadante del extracto bacteriano se sometió a varios ciclos de calentamiento a 60°C, centrifugación, recolección del sedimento y solubilización a 4°C en tampón con EDTA. Cada paso de la purificación se verificó por electroforesis en poli-acrilamida en presencia de SDS. Cuando se consideró que el polímero estaba suficientemente puro se dializó la solución frente a agua tipo I y se liofilizó, manteniendo el polímero liofilizado en lugar seco y frío hasta su utilización.

### 2.3. Caracterización del biopolímero tipo elastina A

Para caracterizar el biopolímero A se realizó una electroforesis en gel de acrilamida (PAGE) en presencia de SDS que permitió estimar de forma aproximada el Peso Molecular del polímero además de verificar su pureza. En la Fig. 1, la calle de la izquierda corresponde a la muestra y la de la derecha a los marcadores (Fermentas SM0431). En dicha figura se observa una buena producción del polímero además de poderlo identificar como electroforéticamente puro. La posición de la banda del polímero coincidió con el marcador de 116 kDa por lo que el biopolímero A tiene este peso molecular aparente.

También se realizó una espectrometría de masas MALDI-TOF en un espectrómetro modelo Q-Star para calcular exactamente el peso molecular del polímero. De dicho análisis se dedujo que el peso molecular es de 112292 Da.

La caracterización física del material se llevó a cabo mediante un estudio reológico. Los ensayos se realizaron en reómetro de esfuerzo controlado AR2000ex (TA Instruments) utilizando platos paralelos con un gap de 250  $\mu$ m. Para la gelificación las soluciones fueron colocadas sobre un plato Peltier termostatzado. El rango de viscoelasticidad lineal se determinó a 1 Hz de frecuencia seleccionándose dentro de este rango una deformación del 0.5% para los barridos de tiempo y temperatura.

Se prepararon muestras en PBS de 50,100,150 y 200 mg/ml de concentración del biopolímero A y se sometieron a un calentamiento entre 4 y 60°C y a una velocidad de 1°C/min, con el fin de obtener sus propiedades reológicas. Se identificó la temperatura de gelificación con el "punto gel" ( $T_{gel}^a$ ), que se define como el punto en que  $G'$  es igual a  $G''$  (Pilosof 2000).

A modo de ejemplo, en la Fig. 2 se muestran el módulo elástico o de almacenamiento ( $G'$ ), módulo viscoso o de pérdida ( $G''$ ) y el ángulo de desfase ( $\delta$ ) para la muestra de 200 mg/ml de concentración. El ángulo de desfase  $\delta$  indica la relación entre la elasticidad y la viscosidad. De dicha figura se obtiene una temperatura de gelificación de 16°C, visualizándose que el inicio de la reestructuración comienza a 10°C y alcanzándose las mejores propiedades mecánicas a los 26°C. Para el resto de las concentraciones la temperatura de gelificación es la misma. De esta manera se puede concluir que una vez introducido el producto en el organismo alcanza sus mejores cualidades mecánicas. Además en la Tabla 1 pueden observarse los valores alcanzados del módulo elástico, módulo viscoso y ángulo de desfase para las distintas concentraciones. De dichos valores se deduce que las propiedades mecánicas del material disminuyen de la muestra de mayor concentración a la de menor concentración. Para la muestra de 200 mg/ml el valor de  $G'$  es de  $3.0 \times 10^5$  Pa y para la de 50 mg/ml de  $5.7 \times 10^4$ .

Otra característica de vital importancia como ya se ha mencionado es el tiempo que el sistema una vez inyectado tarda en gelificar a la temperatura corporal, es decir a producirse su autoensamblado y el cambio de sus propiedades mecánicas y en especial de su viscosidad para que no se produzca su dispersión en el interior del organismo. En este sentido y para conocer la cinética de gelificación se realizaron ensayos reológicos en modo isoterma y a 37°C, de manera que se estudiaron las variaciones de las propiedades reológicas, respecto al tiempo, de las disoluciones del

## ES 2 344 097 B1

copolímero A en solución PBS. La Fig. 3 muestra los resultados obtenidos para la muestra de concentración de 200 mg/ml. Como se observa en dicha figura, tiempos de calentamiento superiores a 4 minutos no afectan significativamente a los valores de los módulos de pérdida y almacenamiento, observándose la formación del gel transcurridos 2 minutos de someter la muestra a 37°C.

En la Tabla 1 también se reflejan datos acerca de la inyectabilidad de las muestras con agujas de diferentes diámetros. Se ensayó con agujas G20 y G26, observándose que hasta una concentración de 150 mg/ml las muestras son fácilmente inyectables con agujas de diámetros de hasta G26 mientras que las de 200 mg/ml se inyectaban con cierta dificultad con agujas de dicho diámetro y con agujas tipo G20 se inyectaban con facilidad.

TABLA 1

*Datos Reológicos y de Inyectabilidad de disoluciones del biopolímero Tipo Elastina Autogelificable A en PBS y a diferentes concentraciones*

Concentración	$t_{gel}(min)$	$G'(Pa)$	$G''(Pa)$	Ángulo de fase	Viscosidad compleja $\eta^*(Pa.s)$	Inyectabilidad	
						G20	G26
200mg/ml	1	$3.0 \times 10^5$	$8.5 \times 10^4$	4-5	7-9	Fácil	Difícil
150mg/ml	9	$1.0 \times 10^5$	$1.5 \times 10^4$	11-12	3-5	Muy Fácil	Fácil
100mg/ml	11	$6.4 \times 10^4$	$1.4 \times 10^4$	7-8	0.7	Muy Fácil	Fácil
50mg/ml	12	$5.7 \times 10^4$	$8.8 \times 10^4$	8-9	0.2	Muy Fácil	Muy Fácil

### Ejemplo 3

#### *Obtención de biopolímeros proteicos recombinantes tipo elastina B*

Como primer ejemplo se describe un copolímero tipo elastina B con capacidad de autoensamblarse por contener bloques alternantes con carácter hidrofóbicos e hidrofílicos de forma que al superar su temperatura de transición inversa cambian drásticamente sus propiedades mecánicas. En este caso los bloques hidrofóbicos corresponden péptidos tipo B donde la secuencia aminoacídica es SEQ ID NO: 4 y los hidrofílicos a péptidos tipo [(D)<sub>2</sub>(E)(D)<sub>2</sub>]. Además, la secuencia aminoacídica C incluye una secuencia bioactiva RGD no específica. Es decir, el biopolímero de este ejemplo tiene la estructura: [(D<sub>2</sub>-E-D<sub>2</sub>)<sub>10</sub>-B<sub>20</sub>]<sub>2</sub>-(G<sub>10</sub>-H-G<sub>10</sub>)<sub>2</sub>.

#### 3.1. Síntesis de la secuencia nucleotídica sintética que codifica el biopolímero B

La síntesis del polímero se realizó tal como se ha descrito en el ejemplo 1. Para sintetizar el bloque hidrofílico de 25 aminoácidos (D<sub>2</sub>-E-D<sub>2</sub>) se generó una secuencia nucleotídica artificial por hibridación de dos oligonucleóticos complementarios con la secuencia SEQ ID NO: 17.

Con el objeto de que la secuencia monomérica anterior pudiera concatenarse para formar la secuencia completa, se situaron convenientemente en los extremos del mismo sendas secuencias de reconocimiento de enzimas de restricción que, al ser utilizadas, dejarán como extremos cohesivos únicamente el codón GTA codificante para el aminoácido Valina. De esta forma se pueden formar cadenas del monómero sin saltos en su marco de lectura y sin la incorporación de codones ajenos a la secuencia deseada.

Siguiendo la técnica de concatenación se obtuvo una secuencia nucleotídica formada por 10 repeticiones de la secuencia inicial, con una longitud de zona codificante de 750 pares de bases y flanqueado también por las secuencias de restricción y sendos codones GTA de enlace.

## ES 2 344 097 B1

En la síntesis del bloque hidrofóbico se partió de un fragmento de mayor tamaño pero que también fue sintetizado a partir de oligonucleótidos de síntesis química. En este caso el monómero peptídico tenía la estructura (B)<sub>20</sub> donde B es SEQ ID NO: 4, codificado por la secuencia nucleotídica SEQ ID NO: 23.

5 También esta vez se usaron las mismas enzimas de restricción y por tanto las mismas secuencias flanqueantes del gen codificante. La secuencia nucleotídica del bloque hidrofílico descrito (D<sub>2</sub>-E-D<sub>2</sub>)<sub>10</sub> y el correspondiente al bloque hidrofóbico (B)<sub>20</sub>, donde C es SEQ ID NO: 4, se fusionaron utilizando las secuencias de restricción citadas situando en el extremo 5' el gen que codifica para el bloque hidrofílico. Posteriormente la secuencia resultante, con una longitud de 1050 pares de bases, se duplicó por la técnica recursiva dando lugar a la secuencia de 2100 pares de bases que  
10 codifica el polipéptido [(D<sub>2</sub>-E-D<sub>2</sub>)<sub>10</sub>-(B)<sub>20</sub>]<sub>2</sub>.

La incorporación de la secuencia bioactiva se realizó por la misma técnica descrita.

La secuencia que codifica la estructura (G<sub>10</sub>-H-G<sub>10</sub>) es SEQ ID NO: 19.

15 En este caso, también se duplicó el fragmento por las mismas técnicas descritas antes de unirlo al tetrabloque de 2100 pares de bases. El producto de la duplicación tenía una longitud de 672 pares de bases codificando un polipéptido de 224 aminoácidos. La incorporación del fragmento con las dos secuencias bioactivas RGD al extremo 3' del fragmento de 2100 pares de bases se realizó por la técnica iterativa recursiva usando las enzimas de restricción ya  
20 mencionadas.

Como resultado de la incorporación de los fragmentos se obtuvo una secuencia de 2772 pares de bases que codifica el polipéptido abreviado:

25 [(D<sub>2</sub>-E-D<sub>2</sub>)<sub>10</sub>-(B)<sub>20</sub>-(D<sub>2</sub>-E-D<sub>2</sub>)<sub>10</sub>-(B)<sub>20</sub>]-[(G)<sub>10</sub>-H-(G)<sub>10</sub>]-[(G)<sub>10</sub>-H-(G)<sub>10</sub>] donde B es SEQ ID NO: 4.

Esta secuencia se incorporó a un vector de expresión previamente modificado para aceptar fragmentos procedentes de la digestión con las enzimas de restricción adecuadas descritas incorporando la secuencia nucleotídica SEQ ID NO: 20 en el extremo 5' del fragmento de 2772 pares de bases y la secuencia GTATGA en el extremo 3' del mismo. El  
30 plásmido resultante comprende una secuencia nucleotídica con un marco abierto de lectura de 2796 pares de bases, SEQ ID NO: 24, que codifica para 931 aminoácidos, SEQ ID NO: 25.

### 3.2 Caracterización del biopolímero tipo elastina B

35 La expresión del biopolímero recombinante B se llevó a cabo del mismo modo que se ha descrito en el ejemplo 2.2.

De la misma forma que en el ejemplo 2 se realizó una electroforesis en gel de acrilamida (PAGE) en presencia de  
40 SDS. En la Fig. 4, la calle de la derecha corresponde a la muestra y la de la izquierda a los marcadores (Fermentas SM0431). En dicha figura se observa una buena producción del biopolímero además de poderlo identificar como electroforéticamente puro. La posición de la banda del biopolímero nos permite estimar que el peso molecular aparente del polímero está entre 75 y 85 kDa.

45 También se realizó una espectrometría de masas MALDI-TOF en un espectrómetro modelo Q-Star para calcular exactamente el peso molecular del polímero. De dicho análisis se dedujo un valor de 78379 Da.

La caracterización física del material se llevó a cabo mediante un estudio reológico como en el caso anterior. Los ensayos se realizaron en reómetro de esfuerzo controlado AR2000ex (TA Instruments, España) usando platos  
50 paralelos con un gap de 250 μm. Para la gelificación las soluciones fueron colocadas sobre un plato Peltier termostático. El rango de viscoelasticidad lineal se determinó a 1 Hz de frecuencia seleccionándose dentro de este rango una deformación del 0.5% para los barridos de tiempo y temperatura.

Se prepararon muestras en PBS de 200 mg/ml de concentración y se sometieron a un calentamiento entre 4  
55 y 60°C y a una velocidad de 1°C/min, con el fin de obtener sus propiedades reológicas. Se identificó la temperatura de gelificación con el "punto gel" (T<sub>gel</sub><sup>a</sup>), que se define como el punto en que G' es igual a G'' (Pilosof 2000).

En la Fig. 5 se representa el módulo elástico o de almacenamiento (G'), módulo viscoso o de pérdida (G'') y el  
60 ángulo de desfase (delta) para la disolución del copolímero B respecto de la temperatura. De dicha figura se obtiene una temperatura de gelificación de 29°C, visualizándose que el inicio de la reestructuración comienza a 25°C y alcanzándose las mejores propiedades mecánicas a los 33°C. Aunque dicha temperatura es inferior a la corporal es una temperatura muy próxima a ella y por lo tanto podrían surgir problemas en zonas corporales en que por algún motivo se produzcan descensos de la temperatura. Además, en la Tabla 2 pueden observarse los valores alcanzados del  
65 módulo elástico, módulo viscoso y ángulo de desfase. El valor de G' es de 2.5x10<sup>5</sup> Pa muy parecido a los 3.0x10<sup>5</sup> Pa del copolímero A.

## ES 2 344 097 B1

En la Fig. 6 se observa la formación del gel pasados 21 minutos ( $t_{gel}$ ) de someter la muestra a 37°C y que tarda unos 37 minutos en alcanzar las propiedades óptimas es decir, presenta una cinética sensiblemente más lenta que la del biopolímero A.

5 En la Tabla 2 también se reflejan datos acerca de la inyectabilidad de las muestras con agujas de diferentes diámetros. Se ensayó con agujas G20 y G26, observándose que las muestras son fácilmente inyectables con ambos tipos de agujas. Dicho resultado es razonable ya que la viscosidad de la disolución del copolímero B para una concentración de 200 mg/ml es comparable a la del copolímero A para concentraciones de 50 mg/ml y a su vez es justificable ya que el peso molecular del copolímero B es inferior al del copolímero A.

10

TABLA 2

*Datos Reológicos y de Inyectabilidad de la disolución del Copolímero Tipo Elastina Autogelificable B en PBS*

15

Concentración	$t_{gel}$ (min)	G'(Pa)	G''(Pa)	Ángulo de fase	Viscosidad compleja $\eta^*$ (Pa.s)	Inyectabilidad	
						G20	G26
200mg/ml	21	$2.5 \times 10^5$	$5.0 \times 10^4$	11-12	0.2-0.4	Muy Fácil	Muy Fácil

20

25

Por tanto de los resultados de los dos ejemplos se concluye que las propiedades del copolímero B son ligeramente inferiores a las del copolímero A presentado en el ejemplo 2. Aunque los módulos elásticos que se alcanzan para los dos copolímeros son muy parecidos, el tiempo y la temperatura de gelificación son sensiblemente mayores para el copolímero B del ejemplo 3.

30

En la Fig. 8 pueden verse unas imágenes de biopolímeros tipo elastina autogelificables disueltos en una solución PBS por debajo de su temperatura de transición, a 4°C, donde se encuentra en estado líquido y por encima de su temperatura de transición, a 37°C, donde se encuentran gelificados.

35

40

45

50

55

60

65

# ES 2 344 097 B1

## REIVINDICACIONES

1. Biopolímero que comprende las secuencias aminoacídicas A, B y C con la estructura

$$(A_n - B_m)_s - C_p,$$

donde,

A tiene la estructura  $(D_{t1}-E_{v1}-D_{t2})$  o la estructura  $(D_{t1}-E_{v2})$ , donde D es SEQ ID NO: 1; E es SEQ ID NO: 2;  $t_1$  y  $t_2$  tienen valores de entre 2 y 4; y  $v_1$  y  $v_2$  tienen valores de entre 1 y 5,

B se selecciona de la lista que comprende SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 4 o SEQ ID NO: 26 (VPAIG),

C tiene la estructura  $(G_{w1}-H_{x1}-G_{w2})$  o  $H_{x2}$ , donde G es SEQ ID NO: 5; H es una secuencia aminoacídica que comprende un péptido que se selecciona de la lista que comprende RGD, LDT, SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 9 o SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 11, SEQ ID NO: 12, SEQ ID NO: 13, SEQ ID NO: 14, SEQ ID NO: 15 o SEQ ID NO: 16;  $w_1$  y  $w_2$  tienen valores de entre 5 y 15; y  $x_1$  y  $x_2$  tienen valores de entre 1 y 5,

n tiene un valor de entre 5 y 15,

m tiene un valor de entre 10 y 70,

s tiene un valor de entre 2 y 4, y

p tiene un valor de entre 1 y 5.

2. Biopolímero según la reivindicación 1 donde A tiene la estructura  $(D_{t1}-E_{v1}-D_{t2})$ .

3. Biopolímero según cualquiera de las reivindicaciones 1 ó 2 donde C tiene la estructura  $(G_{w1}-H_{x1}-G_{w2})$ .

4. Biopolímero según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3 donde la secuencia aminoacídica de H contiene el péptido RGD.

5. Biopolímero según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4 donde la secuencia aminoacídica de H que contiene el péptido RGD es SEQ ID NO: 6.

6. Biopolímero según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5 donde la secuencia aminoacídica B es SEQ ID NO: 3.

7. Biopolímero según la reivindicación 6, donde m tiene un valor de entre 55 y 65.

8. Biopolímero según cualquiera de las reivindicaciones 6 ó 7 que comprende los péptidos B, D, E, G, D y H con la estructura  $[(D_2-E-D_2)_{10}-B_{60}]_2-(G_{10}-H-G_{10})_2$ .

9. Biopolímero según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5 donde el péptido B es SEQ ID NO: 4.

10. Biopolímero según la reivindicación 9, donde m tiene un valor de entre 15 y 25.

11. Biopolímero según cualquiera de las reivindicaciones 9 ó 10 que comprende los péptidos B, D, E, G y H con la estructura  $[(D_2-E-D_2)_{10}-B_{20}]_2-(G_{10}-H-G_{10})_2$ .

12. Ácido nucleico que comprende una secuencia nucleotídica que codifica para la secuencia aminoacídica del biopolímero según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 11.

13. Vector de expresión que comprende el ácido nucleico según la reivindicación 12.

14. Célula aislada transfectada con el vector según la reivindicación 13.

15. Uso del biopolímero según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 11, para la preparación de un implante.

16. Implante que comprende el biopolímero según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 11.

17. Implante según la reivindicación 16, donde el biopolímero tiene una concentración de entre 30 y 300 mg/ml.



## ES 2 344 097 B1

18. Implante según cualquiera de las reivindicaciones 16 ó 17, donde se presenta en una forma adaptada a la administración parenteral.

19. Implante según cualquiera de las reivindicaciones 16 a 18 donde incluye además una sustancia activa.

20. Uso del implante según cualquiera de las reivindicaciones 16 a 19, para el tratamiento de cartílago o hueso.

21. Uso del implante según cualquiera de las reivindicaciones 16 a 19, para el tratamiento del tejido nervioso o médula espinal.

22. Uso del implante según cualquiera de las reivindicaciones 16 a 19, para el tratamiento de necrosaciones de varices.

23. Vehículo farmacéuticamente aceptable que comprende el biopolímero según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 11.

24. Vehículo farmacéuticamente aceptable según la reivindicación 23, donde el biopolímero tiene una concentración de entre 30 y 300 mg/ml.

25. Vehículo farmacéuticamente aceptable según cualquiera de las reivindicaciones 23 ó 24, donde se presenta en una forma adaptada a la administración parenteral.

26. Uso del vehículo farmacéuticamente aceptable según cualquiera de las reivindicaciones 23 a 25, para la liberación controlada de fármacos.

27. Método para la obtención del biopolímero según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9 que comprende:

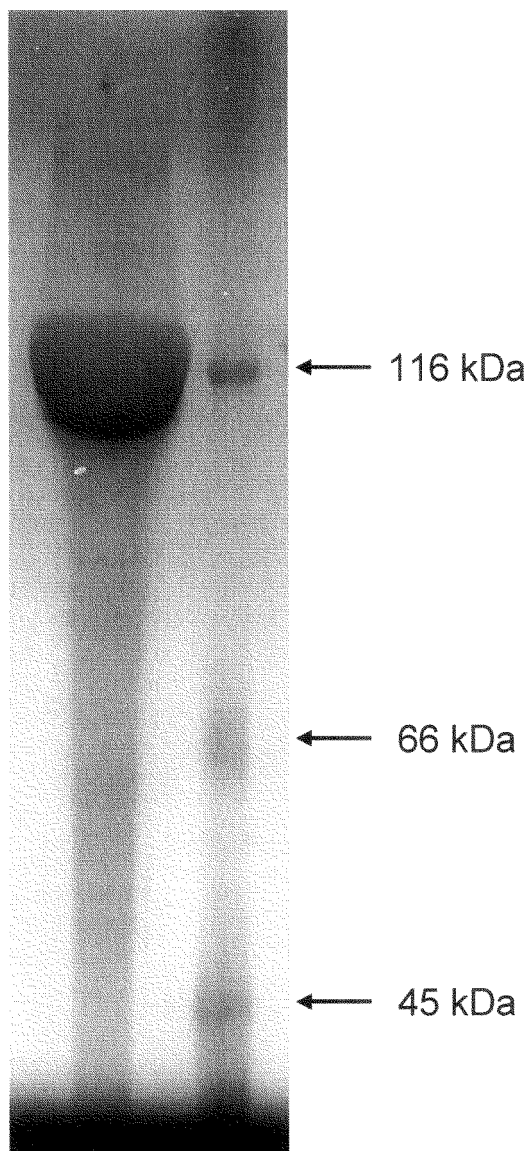
a. insertar el ácido nucleico de la reivindicación 12 en un vector de expresión,

b. transfectar una célula con el vector de expresión obtenido según el apartado (a),

c. seleccionar la célula transfectada según el apartado (b) que comprende el ácido nucleico de la reivindicación 12,

d. expresar el ácido nucleico en la célula según el apartado (c) y

e. purificar el biopolímero producido según el apartado (d).



**FIG. 1**

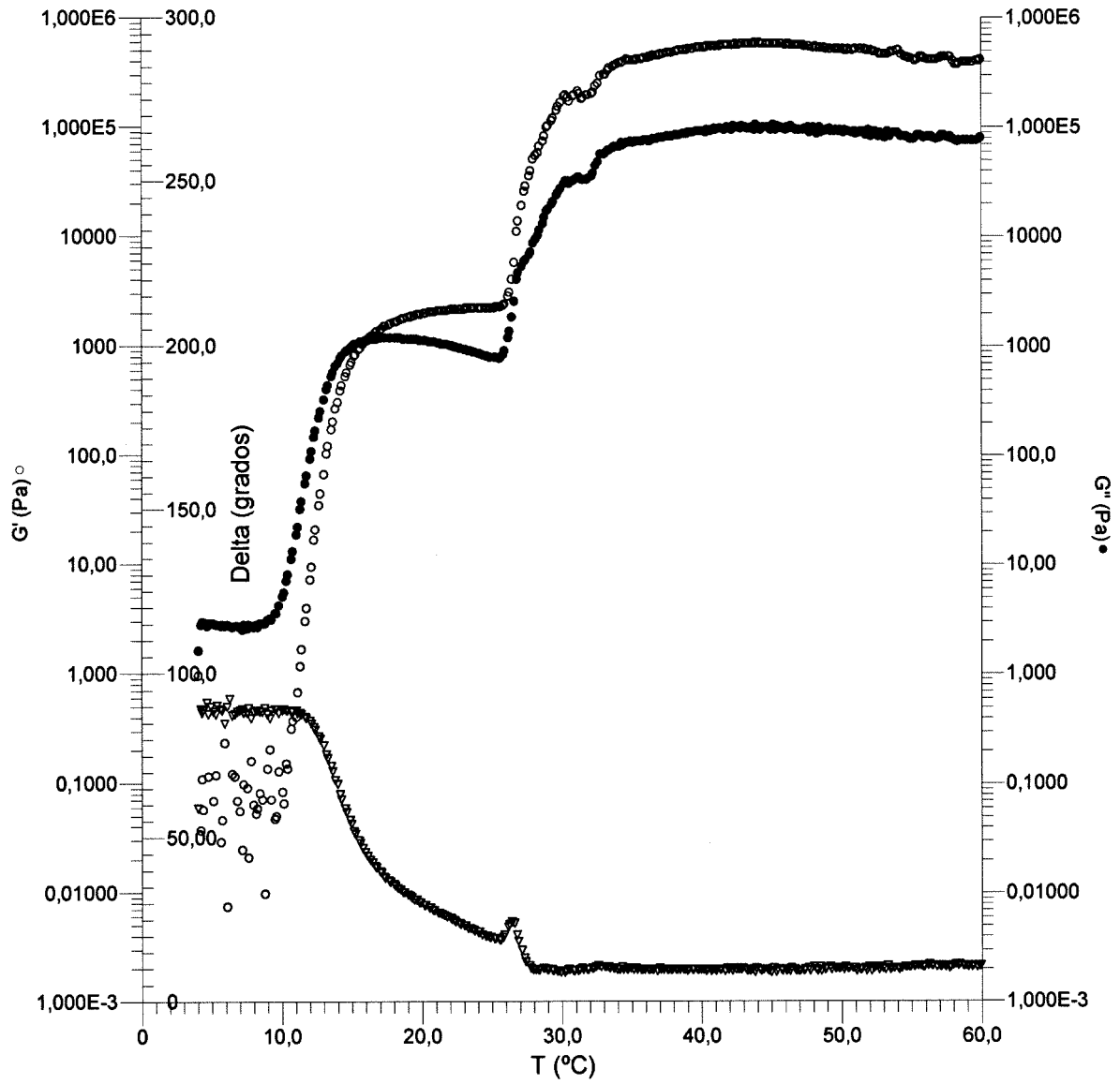


FIG. 2

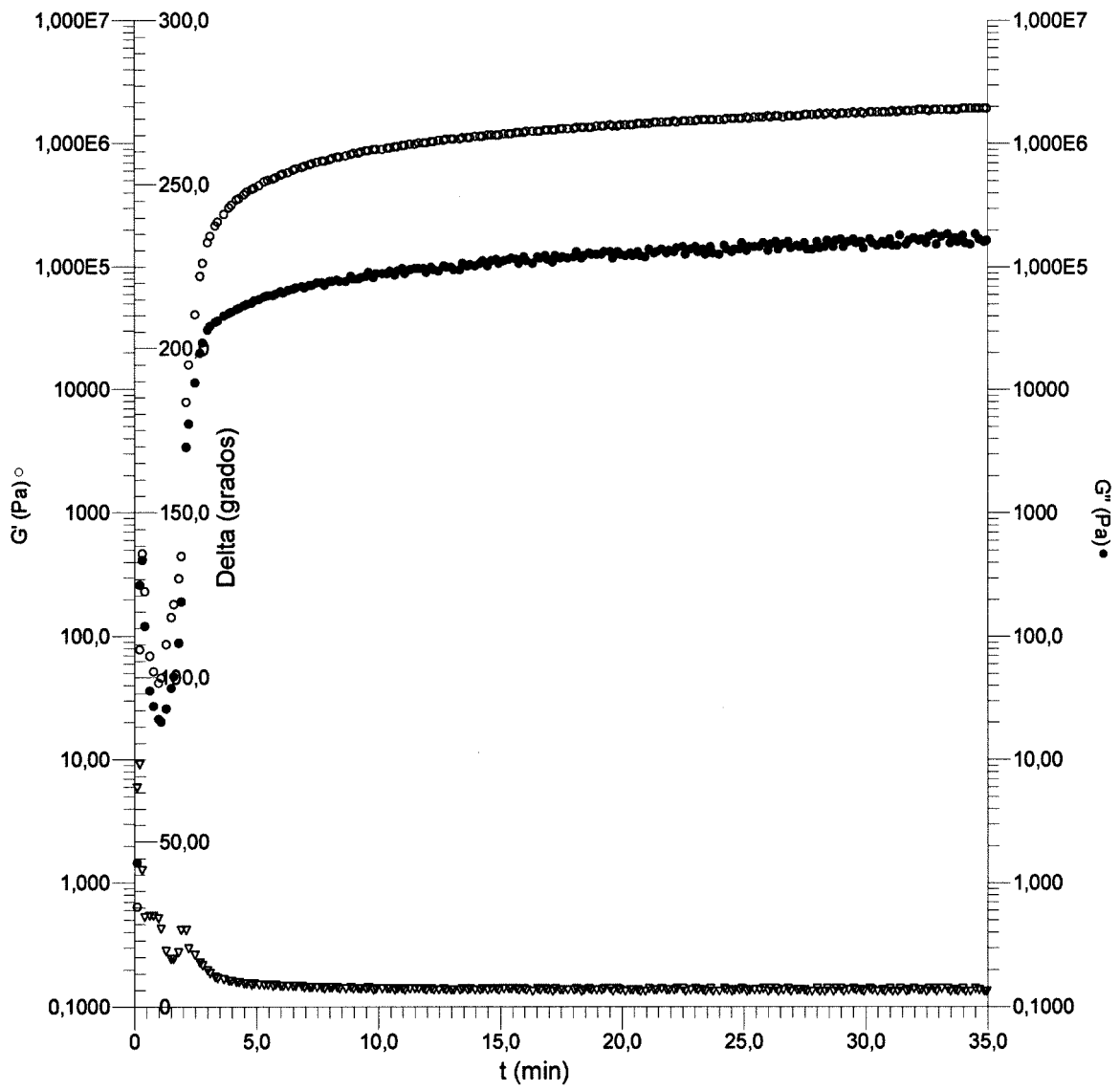
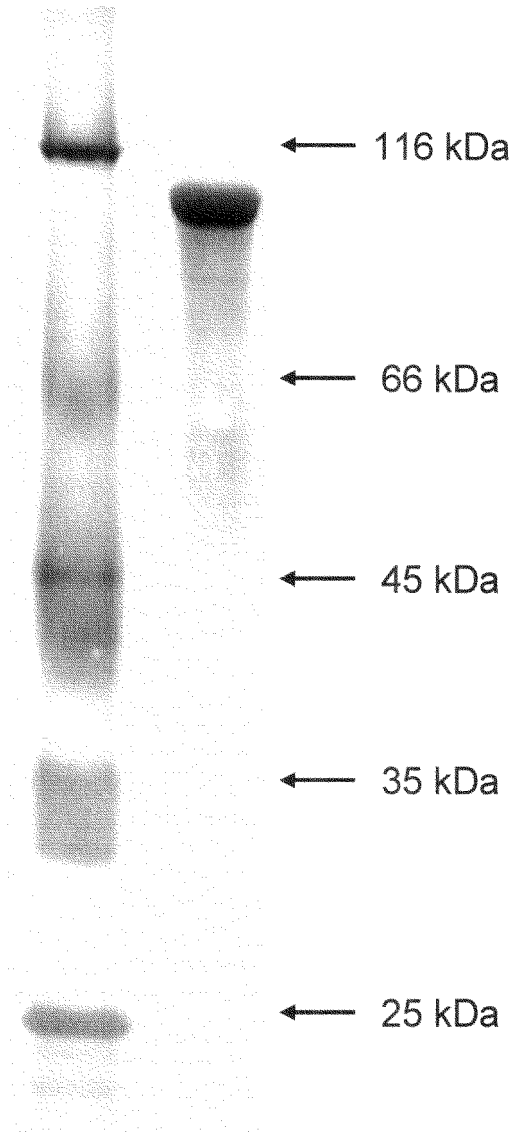


FIG. 3



**FIG. 4**

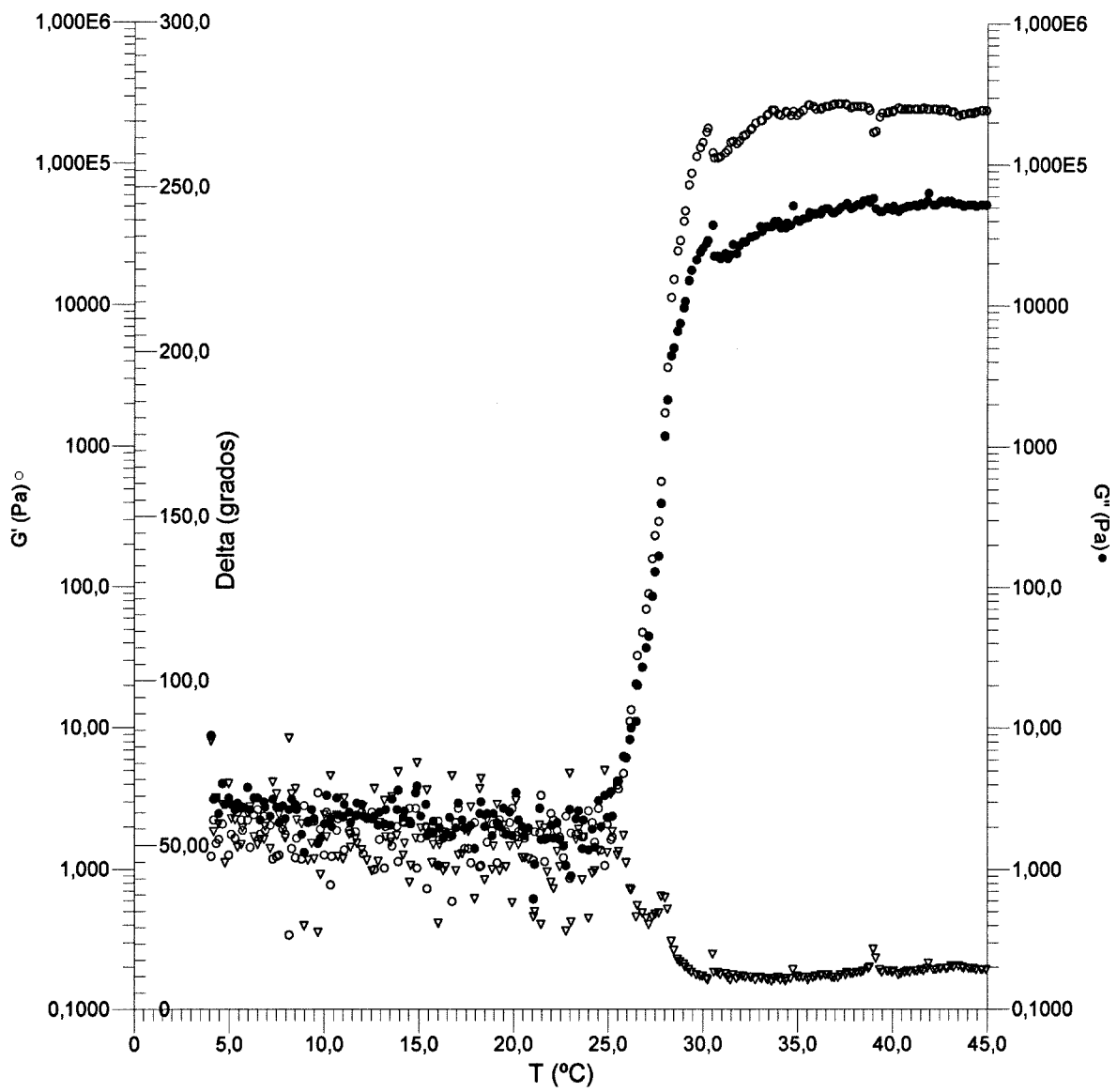


FIG. 5

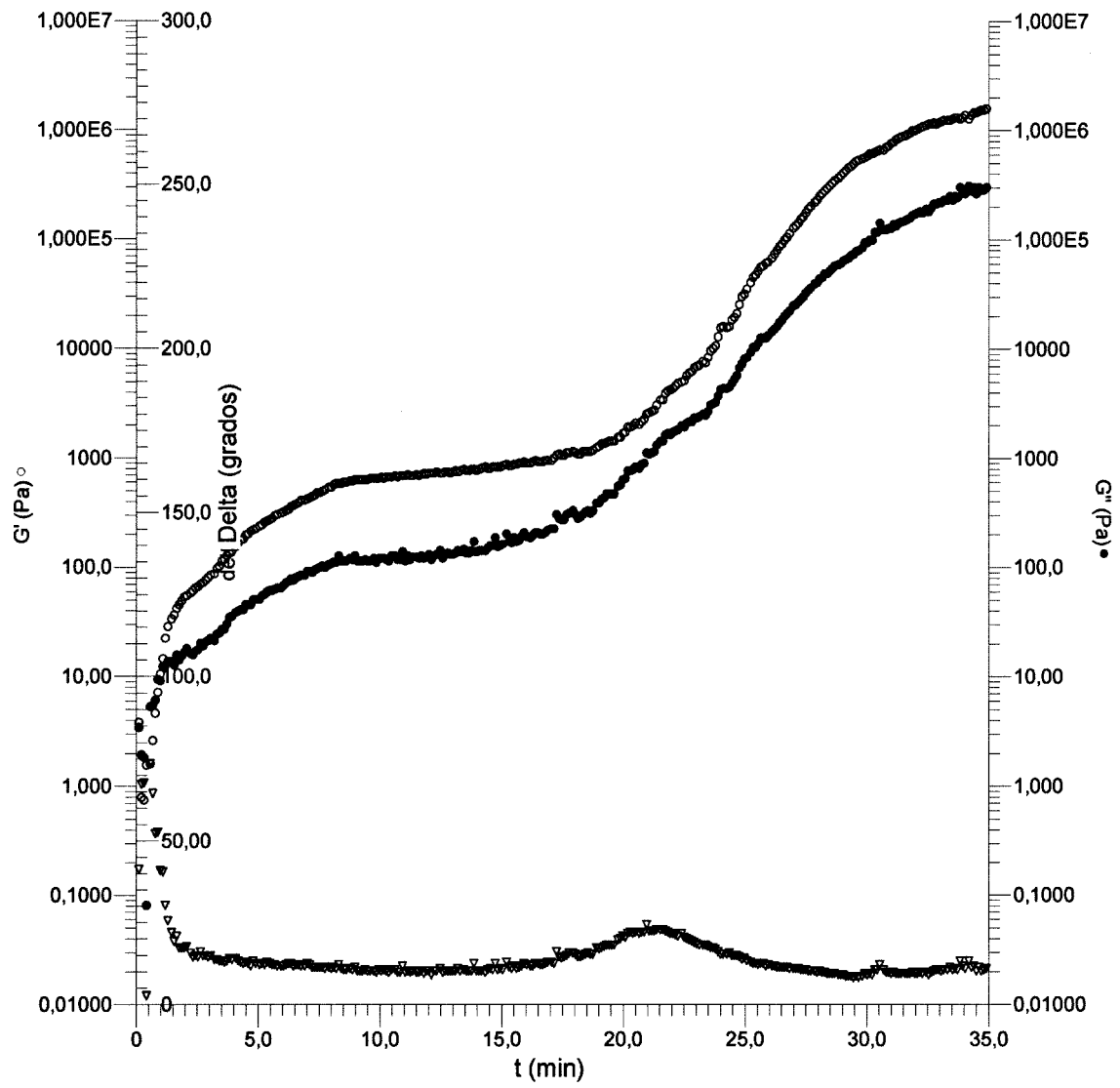
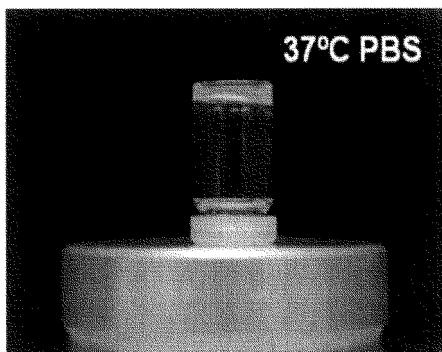
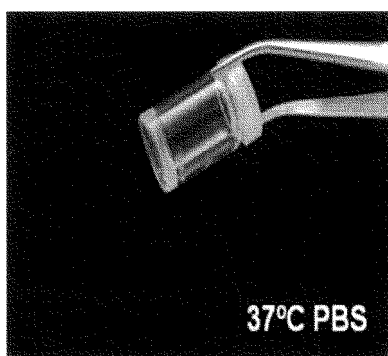
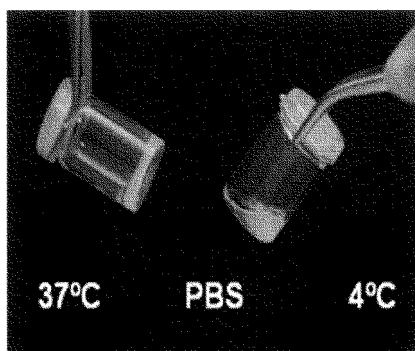


FIG. 6



**FIG. 7**





OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

① ES 2 344 097

② N° de solicitud: 200900438

③ Fecha de presentación de la solicitud: 16.02.2009

④ Fecha de prioridad:

INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TÉCNICA

⑤ Int. Cl.: Ver hoja adicional

DOCUMENTOS RELEVANTES

Categoría	⑥ Documentos citados	Reivindicaciones afectadas
A	WO 2008033847 A2 (EMORY UNIVERSITY). 20.03.2008, resumen; página 2, párrafo [006]; página 5, párrafo [019]; página 6, párrafo [022]; página 8, párrafos [029]-[030]; página 9, párrafos [036]- [037]; página 20, párrafo [097] a página 21, párrafo [0100]; página 87, tabla 14; reivindicaciones 14-15, 22, 31.	1, 3, 12-16, 20, 23-24
A	ARIAS et al. Tailored recombinant elastin-like polymers for advanced biomedical and nano(bio)technological applications. Biotechnology letters. 2006, Vol. 28, páginas 687-695, especialmente páginas 687-688, 690-693; figura 2.	1-4, 12-15, 24, 26-27
A	CHOW et al. Peptide-based biopolymers in biomedicine and biotechnology. Recuperado de internet: <URL:http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2575411/pdf/nihms68589.pdf/?tool=pmcentrez>. Recuperado de internet el 20-05-2010, [en línea] enero 2009, páginas 1-70, especialmente páginas 3, 5, 13, 18; tabla 5; figura 1.	1, 4, 12-14, 16, 18-19, 24, 27
A	US 20050180945 A1 (CHAIKOF, EL and SUN, XL). 18.08.2005, resumen; página 7, párrafos [89]-[94]	1-3

**Categoría de los documentos citados**

X: de particular relevancia

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

A: refleja el estado de la técnica

O: referido a divulgación no escrita

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

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

**El presente informe ha sido realizado**

para todas las reivindicaciones

para las reivindicaciones nº:

**Fecha de realización del informe**

10.06.2010

**Examinador**

Mª D. García Grávalos

**Página**

1/5

CLASIFICACIÓN DEL OBJETO DE LA SOLICITUD

**A61K 38/16** (2006.01)

**A61L 27/22** (2006.01)

**C12N 15/00** (2006.01)

**A61K 47/48** (2006.01)

**A61P 9/14** (2006.01)

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

A61K, A61L, C12N, A61P

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

INVENES, EPODOC, WPI, NPL, PUBMED, BIOSIS, MEDLINE, PUBCHEM, EMBASE, EBI, GENBANK, ESPACENET, PATENTSCOPE, USPTO PATENT DATABASE, GOOGLE SCHOLAR, GOOGLE PATENTS

Fecha de Realización de la Opinión Escrita: 10.06.2010

**Declaración**

<b>Novedad (Art. 6.1 LP 11/1986)</b>	Reivindicaciones 1-27	<b>SÍ</b>
	Reivindicaciones	<b>NO</b>
<b>Actividad inventiva (Art. 8.1 LP 11/1986)</b>	Reivindicaciones 1-27	<b>SÍ</b>
	Reivindicaciones	<b>NO</b>

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

**Base de la Opinión:**

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

**1. Documentos considerados:**

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

Documento	Número Publicación o Identificación	Fecha Publicación
D01	WO 2008033847 A2	20-03-2008
D02	ARIAS et al. Biotechnology letters. 2006. Vol. 28, páginas 687-695.	2006
D03	CHOW et al. RL: <a href="http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2575411/pdf/nihms68589.pdf?tool=pmcentrez">http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2575411/pdf/nihms68589.pdf?tool=pmcentrez</a> >. Recuperado de internet el 20-05-2010, [en línea] enero 2009, páginas 1-70.	Enero 2009
D04	US 20050180945 A1	18-08-2005

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

La presente solicitud divulga polímeros proteicos recombinantes que comprenden dominios tipo elastina, así como dominios bioactivos y dominios para inducir la biodegradabilidad del polímero (reivindicaciones 1-11). Se refiere también a ácidos nucleicos, vectores y células hospedadoras para la producción de los polímeros por ingeniería genética, y a un método para su expresión y purificación (12-14). Adicionalmente, la solicitud divulga medicamentos, implantes, y vehículos farmacéuticamente aceptables que comprenden los polímeros de la invención (reivindicaciones 15-27).

El documento D01 divulga copolímeros proteicos que comprenden motivos de elastina. Se refiere también a ácidos nucleicos, vectores y células productoras para la obtención de los copolímeros por ingeniería genética, así como a métodos para llevar a cabo dicho procedimiento. Adicionalmente, el documento divulga implantes, medicamentos y vehículos de sustancias con actividad terapéutica basados en los copolímeros (ver resumen; página 2, párrafo [006]; página 5, párrafo [019]; página 6, párrafo [022]; página 8, párrafos [029]-[030]; página 9, párrafos [036]- [037]; página 20, párrafo [097] a página 21, párrafo [0100]; página 87, tabla 14; reivindicaciones 14-15, 22, 31).

El documento D02, de los propios inventores, divulga polímeros peptídicos recombinantes que comprenden dominios de tipo elastina y dominios de adhesión celular, y la aplicación de los mismos en el desarrollo de materiales útiles en biomedicina y nanobiotecnología (ver páginas 687-688, 690-693; figura 2)

El documento D03 consiste en una revisión de distintos biomateriales de naturaleza peptídica. En particular, divulga biopolímeros recombinantes basados en motivos repetitivos tipo elastina. Estos biopolímeros comprenden también ligandos específicos que les confieren funcionalidades particulares en relación con la adhesión celular y el crecimiento tisular. Asimismo, D03 divulga el uso de los biopolímeros en la preparación de implantes, y vehículos de fármacos específicamente dirigidos a tumores (ver páginas 3, 5, 13, 18; tabla 5; figura 1).

El documento D04 divulga copolímeros que comprenden bloques peptídicos de tipo elastina, y que contienen además grupos de anclaje a superficies empleados para producir superficies que mimetizan membranas (ver, resumen; página 7, párrafos [89]-[94]).

**1. NOVEDAD (Art. 6.1 LP 11/1986)****1.1. REIVINDICACIONES 1-27.**

Se considera que D01 es el documento más cercano al objeto de la presente solicitud en el estado de la técnica, pues anticipa copolímeros peptídicos recombinantes que contienen motivos repetidos idénticos a algunos de los motivos comprendidos en los biopolímeros de la invención, en particular (VPGVG)2VPGEG(VPGVG)2 y VPGIG. Además, anticipa ácidos nucleicos, vectores y células para la obtención de los polímeros por ingeniería genética, siguiendo una metodología idéntica a la divulgada por los inventores. También de forma análoga a la solicitud, D01 anticipa implantes biocompatibles, agentes embólicos y vehículos de fármacos, comprendiendo todos ellos los mencionados biopolímeros.

Hoja adicional

La diferencia esencial entre la presente solicitud y D01 se basa en la composición de los biopolímeros. Los biopolímeros de la invención, aunque contienen los ya mencionados motivos repetidos de D01, no los presentan con los mismos grados de repetición, como ocurre con (VPGVG)2VPGEG(VPGVG)2. Pero sobre todo, los polímeros de la invención comprenden además otras secuencias peptídicas que les confieren un comportamiento físico y químico singular en el ambiente fisiológico en el cual se basan sus diferentes aplicabilidades.

Por su parte, D02 anticipa polipéptidos que contienen los motivos (VPGVG)2VPGEG(VPGVG)2, VPGIG, RGD y RDEV. En este caso, el bloque de los polímeros de D02 que comprende (VPGVG)2VPGEG(VPGVG)2 se encuentra en un número de repeticiones dentro del rango divulgado en la solicitud. Asimismo, D02 anticipa una metodología de obtención de los copolímeros recombinantes análoga a la de la invención, y el uso de los mismos como vehículos para la liberación controlada de fármacos.

De nuevo, la diferencia entre la presente invención y D02 estriba en la diferente composición de los polipéptidos de la invención, los cuales presentan una mayor sofisticación estructural y funcional.

Por lo tanto, en base a la clara diferencia existente entre los biopolímeros de la invención y los divulgados en el estado de la técnica anterior y a que dichos biopolímeros constituyen el elemento común a todos los productos, usos y procedimientos reivindicados en la solicitud, se considera que las reivindicaciones 1-27 cumplen con el requisito de novedad (Art. 6.1 LP 11/1986).

## 2. ACTIVIDAD INVENTIVA (Art. 8.1 LP 11/1986)

### 2.1. REIVINDICACIONES 1-27

La presente solicitud reivindica unos copolímeros cuyo diseño se basa en elementos ya conocidos en el estado de la técnica. Los documentos D01 y D02, por ejemplo, anticipan la capacidad de polímeros con motivos de tipo elastina de gelificar al ser sometidos a una temperatura de aproximadamente 30°C, de presentar bioactividad conferida por la inclusión de ciertos ligandos o secuencias peptídicas, o de actuar como vehículos que liberan fármacos de forma controlada en el organismo.

Sin embargo, según se desprende de la descripción, y a partir del análisis del estado de la técnica, un experto en la materia puede concluir que el diseño y la construcción de biopolímeros recombinantes de tipo elastina con composiciones particulares, que les confieren funcionalidades también particulares, no resulta obvio y requiere un esfuerzo inventivo. En consecuencia, se considera que las reivindicaciones 1-27 cumplen con el requisito de actividad inventiva (Art. 8.1 LP 11/1986).

Los documentos D03 y D04, se refieren al estado de la técnica y no se consideran relevantes en relación con el objeto de la invención.