

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 455 441**

21 Número de solicitud: 201231431

51 Int. Cl.:

A61L 27/22 (2006.01)

A61K 9/00 (2006.01)

C07K 14/78 (2006.01)

C08L 89/00 (2006.01)

12

SOLICITUD DE PATENTE

A1

22 Fecha de presentación:

14.09.2012

43 Fecha de publicación de la solicitud:

15.04.2014

56 Se remite a la solicitud internacional:

PCT/ES2013/070642

71 Solicitantes:

**UNIVERSIDAD DE VALLADOLID (100.0%)
PLAZA SANTA CRUZ, Nº 5 BAJO
47002 Valladolid ES**

72 Inventor/es:

**RODRÍGUEZ CABELLO, José Carlos;
TESTERA GORGOJO, Ana María;
ALONSO RODRIGO, Matilde;
ARIAS VALLEJO, Francisco Javier;
GONZÁLEZ DE TORRE, Israel;
FERNÁNDEZ COLINO, Alicia y
SANTOS GARCÍA, Mercedes**

74 Agente/Representante:

PONS ARIÑO, Ángel

54 Título: **HIDROGEL ÚTIL COMO SOPORTE INYECTABLE PARA APLICACIÓN EN TERAPIA CELULAR Y COMO SISTEMA DE LIBERACIÓN CONTROLADA DE FÁRMACOS**

57 Resumen:

Hidrogel útil como soporte inyectable para aplicación en terapia celular y como sistema de liberación controlada de fármacos.

La presente invención se refiere a hidrogeles generados "in situ", en condiciones fisiológicas, por entrecruzamiento químico de dos biopolímeros tipo elastina mediante una reacción "click chemistry". Estos hidrogeles son no citotóxicos y biocompatibles, por lo que pueden comprender células y/o principios activos y ser así empleados para la elaboración de medicamentos o como implantes en procedimientos de regeneración tisular. También son aplicables a la biocompatibilización y bioactivación de implantes sólidos mediante su recubrimiento y como sistemas para la liberación controlada de fármacos.

ES 2 455 441 A1

DESCRIPCIÓN

Hidrogel útil como soporte inyectable para aplicación en terapia celular y como sistema de liberación controlada de fármacos

5 La presente invención se encuadra en el campo de la medicina regenerativa y de los sistemas de liberación controlada de fármacos, específicamente dentro de los hidrogeles generados "in situ", en condiciones fisiológicas, por entrecruzamiento químico de dos biopolímeros de tipo elastina mediante una reacción "click chemistry". Estos hidrogeles son no citotóxicos y biocompatibles, por lo que pueden comprender células y/o principios activos y ser así
10 empleados para la elaboración de medicamentos o como implantes en procedimientos de regeneración tisular. También son aplicables a la biocompatibilización y bioactivación de implantes sólidos mediante su recubrimiento.

ESTADO DE LA TÉCNICA

15 Son muchos y variados los métodos de entrecruzamiento físico y químico que han sido anteriormente desarrollados para diseñar hidrogeles biodegradables. El entrecruzamiento químico es un método altamente versátil, habiéndose utilizado muchas reacciones de entrecruzamiento quimioselectivas en la preparación de hidrogeles, tales como la polimerización radicalaria de monómeros de bajo peso molecular en presencia de agentes entrecruzantes o por
20 polimerización radicalaria de polímeros solubles en agua derivatizados con grupos polimerizables, entrecruzamiento covalente por formación de bases de Schiff con aldehídos o por reacciones de adición con agentes entrecruzantes como el 1,6-hexametilendiisocianato, la divinilsulfona, o polietilenglicol-ditio, entrecruzamientos por reacciones de condensación con carbodiimidas EDC, etc. También se ha descrito la formación de hidrogeles vía enzimática utilizando transglutaminasa con polietilenglicol (PEG) funcionalizado con grupos glutaminilos. Sin embargo, los agentes entrecruzantes y el disolvente utilizados suelen ser compuestos tóxicos que han de ser extraídos de estos geles antes
25 de poder ser éstos aplicados en clínica. Además, muchos de estos agentes entrecruzantes pueden participar de reacciones no deseables con las sustancias bioactivas presentes en la matriz del hidrogel o en el entorno fisiológico.

Los métodos de entrecruzamiento hasta ahora utilizados con los recombinámeros tipo elastina (ELRs, de sus siglas en inglés "Elastin-Like Recombinamers") implican métodos químicos de entrecruzamiento por radiación (Lee J, Macosko
30 CW, Urry DW, 2001; *Macromolecules*, 34:5968–5974), fotoiniciación (Nagapudi K, *et al.*, 2002, *Macromolecules*; 35:1730–1737), con diferentes agentes químicos entrecruzantes (Trabicc-Carlson K, Setton LA, Chilkoti A, 2003, *Biomacromolecules*; 4:572–580) en solventes orgánicos o con entrecruzantes tóxicos o entrecruzamiento enzimático con transglutaminasas. Asimismo, se ha demostrado cómo copolímeros en bloque de ELRs forman redes tridimensionales físicamente entrecruzadas (Nagapudi K, *et al.*, 2005; *Macromolecules*, 38(2):345–354). Los hidrogeles o matrices obtenidas siguen manteniendo la capacidad de respuesta a estímulo de los polímeros que les constituyen, lo que posibilita una nueva variable para poder modular el comportamiento mecánico del hidrogel, al poder controlar el grado de solvatación de los hidrogeles de ELRs entrecruzados (Trabicc-Carlson K, Setton LA, Chilkoti A, 2003; *Biomacromolecules*, 4:572–580). En concreto, se ha comprobado cómo se pueden obtener por entrecruzamiento químico haciendo uso de diferentes agentes entrecruzantes como hexametildiisocianato o glutaraldehído, matrices o
40 hidrogeles en forma de láminas delgadas para hacer cultivos celulares en superficie (2D) o con estructura interna adecuada para realizar cultivos en tres dimensiones (3D) y a partir de estos recombinámeros, bioprocetables y capaces de acomodar diferentes tipos de células humanas (HUVEC y HFF1). Si el entrecruzamiento del polímero ELR se lleva a cabo sobre un molde litografiado mediante la técnica de impresión por microcontacto ("microcontact printing") se producen matrices litografiadas con la topografía deseada, de gran interés para cultivos celulares ya que podrían permitir la orientación o guiado celular así como su confinamiento en zonas determinadas (Martín L., *et al.*, 2009; *Soft Matter*, 5: 1591–1593). Asimismo se han preparado matrices microporosas que sirven como substratos en aplicaciones en medicina regenerativa en 3D (Martín L., *et al.*, 2009, *Biomacromolecules*, 10, 3015–3022). Estos hidrogeles porosos basados en ELRs que contienen la secuencia de adhesión celular REDV específica de endotelio son biocompatibles. Además, la estructura porosa interconectada obtenida hace que sean viables en la infiltración de células HUVEC.
50

Otra área donde los ELR entrecruzados han encontrado su nicho es en la dosificación controlada de fármacos. El objetivo principal de la liberación controlada es conseguir la cantidad correcta del agente activo en el momento adecuado y en el lugar preciso. Este método de liberación se usa habitualmente para prolongar el tiempo en que la dosis terapéutica está presente de forma efectiva en el organismo, tratando de eliminar o minimizar las concentraciones que exceden los requerimientos terapéuticos. Aunque muchas han sido las tentativas, lo cierto es que conseguir una liberación sostenida durante tiempos prolongados no es un objetivo trivial.
55

Así, se han empleado un amplio rango de materiales para controlar la liberación de drogas y de otros agentes activos. Entre estos materiales es destacable la utilización de sistemas poliméricos. Se han desarrollado hidrogeles constituidos por copolímeros sintéticos para ser aplicados en la liberación sostenida de fármacos. Sin embargo, los polímeros producidos por síntesis química presentan como principal problema la polidispersidad, que implica que no existe un control absoluto sobre su composición.
60

En contraposición a los polímeros de síntesis química, los polímeros proteicos recombinantes muestran varias propiedades interesantes como la ausencia de polidispersidad y el control absoluto sobre su composición. De entre los polímeros proteicos recombinantes, es destacable la atención que están recibiendo los ELR también en este área, como consecuencia de su comportamiento inteligente y auto-ensamblable y su biocompatibilidad. Todos estos parámetros son
65

críticos a la hora de diseñar un sistema de liberación controlada. Como consecuencia de este atractivo, la comunidad científica ha diseñado diversas aproximaciones basadas en la utilización de ELRs concretos para dosificar fármacos. Por ejemplo, recientemente, el grupo de Chilkoti ha creado hidrogeles elastoméricos que portan residuos de cisteína espaciados periódicamente y cuyo entrecruzamiento viene mediado por puentes disulfuro (Asai D., *et al.*, 2012, *Biomaterials*, 33, 5451-5458). Aunque con esta aproximación se consigue la formación de un hidrogel bajo condiciones fisiológicas ligeramente oxidativas, los estudios realizados *in vitro* muestran que la liberación de la proteína tomada como fármaco modelo no se prolonga más allá de una semana. En definitiva, existe un amplio potencial de mejora en lo referente a hidrogeles elastoméricos capaces de dosificar fármacos de forma sostenida y prolongada en el tiempo.

A pesar de la enorme variedad de técnicas de entrecruzamiento propuestas en la literatura, muchos de estos métodos no pueden aplicarse en la obtención de matrices de ELR inyectables que exigen una inyección de los precursores en disolución acuosa seguida de la formación *in situ* del correspondiente hidrogel, debido a la toxicidad de los reactivos o de los productos secundarios de la reacción y de los disolventes orgánicos; o las cinéticas de la reacción de entrecruzamiento excesivamente lentas. Es por ello, que merece la pena destacar la obtención de matrices físicas elásticas y con diferentes topografías, a partir de copolímeros ELR con estructura de tetrabloque y carácter anfífilo. Se han preparado en condiciones fisiológicas y poseen comportamiento reversible sol-gel-sol con la temperatura, por lo que poseen grandes posibilidades de aplicación en biomedicina (Martín L., *et al.*, 2010; *Soft Matter*, 6: 1121-1124). Por otro lado, Chilkoti *et al.* han demostrado que se pueden formar hidrogeles biocompatibles de ELR químicamente entrecruzados en solución acuosa, en condiciones fisiológicas y con una cinética de reacción muy adecuada, gracias a la presencia de los grupos amino libres de los restos de lisina presentes en su composición con un entrecruzante organofosforado, de futura aplicación en la formación *in situ* de hidrogeles entrecruzados (Lim D.W.; *et al.*, 2007; *Biomacromolecules*, 8(5):1463-1470). Sin embargo, es deseable prescindir de cualquier tipo de agente entrecruzante químico en reacciones de este tipo que tienen lugar *in situ*, ya que la toxicidad del mismo puede comprometer la aplicación clínica de los hidrogeles así generados.

En resumen es necesario disponer de hidrogeles útiles en aplicaciones clínicas, tales como en la liberación controlada de fármacos o en medicina regenerativa, que se formen rápida y fácilmente en condiciones fisiológicas, *in situ*, por la combinación de varios biopolímeros, y que no presenten toxicidad como por ejemplo, la derivada del uso de agentes entrecruzantes, catalizadores o disolventes orgánicos. Estos hidrogeles, además de ser biocompatibles, deben ser estables, versátiles, presentar unas propiedades mecánicas adecuadas y ser biodegradables.

DESCRIPCIÓN DE LA INVENCION

La presente invención proporciona un hidrogel formado por dos biopolímeros de tipo elastina entrecruzados entre sí de manera covalente mediante una reacción de "click chemistry". Este hidrogel presenta las siguientes ventajas:

- Los dos biopolímeros que forman el hidrogel pueden encontrarse en forma líquida, por lo que pueden ser inyectados en el tejido de interés y el hidrogel se forma *in situ* rápida (en menos de dos minutos) y fácilmente por la combinación de ambos biopolímeros en condiciones fisiológicas. Esta característica permite la aplicación clínica del hidrogel utilizando una vía de administración no invasiva para el paciente (inyección).
- El hidrogel presenta una elevada estabilidad. Además, posee unas propiedades mecánicas adecuadas de suturabilidad y manejabilidad.
- El hidrogel presenta una elevada versatilidad, pudiendo comprender distintos motivos de unión celular y funcionar así como vehículo de multitud de tipos celulares.
- El hidrogel, así como sus productos de degradación, es biocompatible y no muestra citotoxicidad. Las células crecen en él y sobreviven adecuadamente, como se muestra en los ejemplos.
- El hidrogel es biodegradable.
- La formación del hidrogel no necesita agentes entrecruzantes químicos, catalizadores, o disolventes orgánicos, lo que minimiza la toxicidad del mismo y puede ser así aplicado de forma segura en clínica.

Por ello, el hidrogel al que se refiere la presente invención posee la capacidad de actuar como soporte o vehículo de gran variedad de principios activos y células, siendo de aplicación, por ejemplo, aunque sin limitarnos, en medicina regenerativa, por ejemplo, como soporte para el crecimiento celular *in vitro* o *in vivo* en procedimientos de terapia celular para la regeneración tisular, como por ejemplo, aunque sin limitarnos, tejido nervioso, cartilaginoso, óseo, cardiovascular, epitelial, etc. Por la rapidez de la reacción que da lugar al hidrogel de la invención y por la gran estabilidad del mismo, este hidrogel es de especial interés en aquellas aplicaciones clínicas en que la terapia tenga que realizarse en entornos con presencia de flujo de fluidos importantes, tales como por ejemplo, aunque sin limitarnos, vejiga, vasos sanguíneos, superficie de ojo o dientes. El hidrogel de la invención también es de aplicación como sistema de liberación local y controlada de fármacos y para la elaboración o recubrimiento de implantes sólidos o semi-sólidos.

La presente invención además propone un método de obtención de este hidrogel en el que los dos biopolímeros de tipo elastina se funcionalizan con el objetivo de introducir en su estructura los grupos reactivos, preferiblemente azida y alquínilo, necesarios para llevar a cabo su entrecruzamiento covalente por cicloaddición 1,3-dipolar en condiciones fisiológicas de pH, temperatura y concentración salinas, sin generar subproductos tóxicos.

Así, un primer aspecto de la invención se refiere a un hidrogel, de ahora en adelante “hidrogel de la invención”, que comprende un biopolímero A y un biopolímero B de tipo elastina entrecruzados directamente entre sí de manera covalente, donde cada uno de dichos biopolímeros comprende:

5 a) al menos 3 repeticiones del péptido SEQ ID NO: 1 (YPY'XY''), donde:

X se selecciona de entre de ente L-lisina, L-serina, L-tirosina, L-treonina, L-cisteina, Ácido Aspártico, Ácido Glutámico, L-arginina, L-asparragina y L-Glutamina,

Y' es glicina o L-Alanina,

10 Y y Y'' son iguales o diferentes y son cualquier aminoácido natural, excepto L-prolina, y son distintos a X, y

b) al menos una repetición del péptido con SEQ ID NO: 2 (YPY'Y''Y'''),

15 donde dichos biopolímeros A y B pueden ser iguales o diferentes.

En la presente invención se entiende por “biopolímero de tipo elastina”, “recombinámeros tipo elastina” “Elastin-Like Recombinamers” o “ELRs”, los polímeros proteicos que comprenden diversos dominios funcionales situados de forma controlada a lo largo de la cadena, que le confieren propiedades muy interesantes como, por ejemplo, propiedades mecánicas, respuesta a la temperatura y reactividad química para formación de enlaces. Los ELRs además poseen muchas similitudes con constituyentes de la matriz extracelular, y pueden contener secuencias bioactivas integradas en su secuencia, por ejemplo, aunque sin limitarnos, para conjugarse con factores de crecimiento, reunirlos y presentarlos a las células, para imitar la función de moléculas endógenas y así promover la adhesión celular específica, la proliferación, la cicatrización, la mineralización ósea, o incluso, para activar su disgregación enzimática y reabsorción durante un proceso natural de remodelado de un implante.

25 La expresión “entrecruzados directamente entre sí de manera covalente” se refiere a que ambos biopolímeros, A y B, se encuentran entrecruzados sin necesidad de un agente entrecruzante.

30 La lisina es el aminoácido preferido para formar los enlaces covalentes entre los dos biopolímeros debido a la facilidad que presenta el grupo amino de su cadena lateral para dar la reacción de sustitución nucleófila con la azida reactiva o una reacción de amidación para dar lugar al derivado alquinilo, como se muestra en los ejemplos de la presente invención. Por ello, en una realización preferida, X es L-lisina.

35 En otra realización preferida los biopolímeros además comprenden al menos uno de los péptidos SEQ ID NO: 3 a SEQ ID NO: 5. En una realización más preferida, los péptidos SEQ ID NO: 3 a SEQ ID NO: 5 están repetidos entre 2 y 250 veces.

40 Los biopolímeros comprendidos en el hidrogel de la invención pueden comprender secuencias con una alta capacidad de retención de principios activos y/o células. Así, dicho hidrogel será capaz de retener tanto principios activos como células vivas. Por tanto, el hidrogel de la invención puede ser empleado como soporte para el crecimiento *in vivo* o *in vitro* de células. Las células y/o principios activos estarán, preferiblemente, dispersos en las disoluciones de cada uno de los dos biopolímeros, de manera que una vez introducido el hidrogel en el lugar donde se requiera la terapia serán capaces de actuar de manera eficaz, bien mediante la liberación controlada del principio activo o bien a través de una buena adhesión y proliferación de las células llegando a regenerar los tejidos dañados y actuando por tanto como un implante eficaz y como una matriz extracelular natural.

45 Por todo ello, en otra realización preferida, al menos uno de los biopolímeros comprende un péptido que se selecciona de la lista que comprende: RGD, LDT, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 8 o SEQ ID NO: 9, o un dominio de unión a heparina o un dominio de unión a azúcares derivado de lectina y aglutinina. Estas secuencias comprendidas en al menos uno de los biopolímeros que forman el hidrogel de la invención, son reconocidas por sus respectivos tipos celulares y propician su unión. El dominio RGD es bien conocido y consiste, como su nombre indica, en los aminoácidos arginina, glicina y ácido aspártico. Este dominio es reconocido por proteínas de la superficie celular de diversos tipos celulares y funciona como un dominio de adhesión celular. La secuencia LTD es una secuencia de adhesión a integrinas. SEQ ID NO: 6 es el dominio REDV, también bien conocido, y que consiste, como su nombre indica, en los aminoácidos arginina, ácido glutámico, ácido aspártico y valina; también funciona como un dominio de adhesión celular y es reconocido por células endoteliales. Un dominio de unión a heparina funciona como dominio de unión celular puesto que es un dominio de unión a glicosaminoglicanos de la superficie celular. Igualmente, un dominio de unión a azúcares permite la unión a las células a través de los azúcares que presentan las glicoproteínas de membrana. La lectina y la aglutinina tienen dominios bien conocidos de unión a azúcares. SEQ ID NO: 8 está presente en la laminina y es reconocida por diversos tipos celulares, SEQ ID NO: 9 es reconocida por neuritas, es decir, cualquier expansión del soma de una neurona, ya sea una dendrita o un axón. Los biopolímeros que contengan SEQ ID NO: 6 o SEQ ID NO: 9 se pueden emplear en la generación de tejidos vasculares o tejidos nerviosos, respectivamente.

60 En una realización más preferida, el hidrogel de la invención además comprende células. En otra realización preferida, el hidrogel de la invención además comprende un principio activo.

Las células comprendidas en el hidrogel de la invención pueden ser tanto de origen autólogo (procedentes del propio paciente al que le va a ser administrado el hidrogel de la invención), como alogénicas (procedentes de otro ser humano) o xenogénicas (procedentes de otros animales).

- 5 Como se emplea aquí, el término “principio activo”, “sustancia activa”, “sustancia farmacéuticamente activa”, “ingrediente activo” ó “ingrediente farmacéuticamente activo”, significa cualquier componente que potencialmente proporcione una actividad farmacológica u otro efecto diferente en el diagnóstico, curación, mitigación, tratamiento, o prevención de una enfermedad, o que afecta a la estructura o función del cuerpo del hombre u otros animales. El término incluye aquellos componentes que promueven un cambio químico en la elaboración del fármaco y están presentes en el mismo de una forma modificada prevista que proporciona la actividad específica o el efecto. En la presente invención, el término principio activo incluye también ácidos nucleicos y proteínas, como por ejemplo aunque sin limitarnos, anticuerpos mono o policlonales, fragmentos de anticuerpos, factores de crecimiento, hormonas, etc.
- 10
- 15 Otro aspecto de la invención se refiere a un método para la obtención del hidrogel de la invención, de ahora en adelante “método de la invención”, que comprende las siguientes etapas:
- a) sustitución, en el biopolímero A, del grupo reactivo del aminoácido X en al menos tres de las repeticiones de la SEQ ID NO: 1 por un grupo seleccionado de entre: grupos alquenoilo, grupos alquino, grupos nitrilo, grupos carbonilo o grupos imina,
 - 20 b) sustitución, en el biopolímero B, del grupo reactivo del aminoácido X en al menos tres de las repeticiones de la SEQ ID NO: 1 por grupos azida; y
 - c) entrecruzamiento de los biopolímeros obtenidos en las etapas (a) y (b) mediante “click chemistry”.

25 Las condiciones de reacción utilizadas en el método de la invención son asimilables a las fisiológicas y la tasa de gelación es modulable, mediante la concentración de los biopolímeros. No se requiere un limitado contenido acuoso o un tampón específico, ácido o base, dado que la reacción funciona bien en un intervalo de pH de, por ejemplo, aunque sin limitarnos, 4 a 11. La reacción de entrecruzamiento que se lleva a cabo en la etapa (c) del método de la invención, y que va a dar lugar finalmente a la formación del hidrogel de la invención, ocurre entre los dos biopolímeros de tipo elastina A y B modificados. Preferiblemente, la obtención de los precursores del hidrogel a partir de los biopolímeros de tipo elastina consiste en la obtención por un lado del biopolímero A modificado y portador de los grupos alquenoilo y por otro del biopolímero B modificado y portador de los grupos azido.

30

Por ello, en una realización preferida del método de la invención, la sustitución del paso (a) se lleva a cabo con grupos alquenoilo. Esta sustitución con grupos alquenoilo se puede llevar a cabo mediante por ejemplo, pero sin limitarnos, reacciones de amidación, esterificación, derivatización del ácido y posterior reacción de esterificación o por transamidación, según el grupo reactivo de la aminoácido X de la SEQ ID NO: 1 en el biopolímero A sea un grupo amino, alcohol o tiol, ácido o amida, respectivamente.

35

Por ello, en una realización más preferida, el aminoácido X de la SEQ ID NO: 1 del biopolímero A es L-Lisina, L-asparagina, L-glutamina o L-arginina y la sustitución del paso (a) con grupos alquenoilo se lleva a cabo mediante amidación catalizada por dicitlohexilcarbodiimida, entre el grupo amino del aminoácido X de la SEQ ID NO: 1 del biopolímero A y un anhídrido de un ácido, haluro de ácido o un alcohol que porta un grupo alquino. En una realización aun más preferida, el anhídrido de ácido, haluro de ácido o el alcohol se seleccionan de entre: anhídrido pentoinico, haluro de propargilo o alcohol propargílico. Esta reacción se ilustra en la Figura 2.

40

45

En otra realización preferida, el aminoácido X de la SEQ ID NO: 1 del biopolímero A es L-treonina, L-serina, L-cisteína, L-tirosina, Ácido Glutámico o Ácido Aspártico y la sustitución del paso (a) con grupos alquenoilo se lleva a cabo mediante esterificación.

50 En otra realización preferida, la sustitución del paso (b) se lleva a cabo mediante sustitución con azida trífica generada “in situ”, como reactivo nucleófilo. Esta reacción se ilustra en la Figura 1.

En otra realización preferida, la etapa (c) se lleva a cabo mediante inyección de los dos biopolímeros resultantes de las etapas (a) y (b) en forma de disolución acuosa. En una realización más preferida, la disolución acuosa tiene un pH de entre 5 y 11. Esta realización se puede llevar a cabo, por ejemplo, aunque sin limitarnos, utilizando una jeringa doble, de manera que los dos polímeros se mezclan en el momento de inyectarlos en el hueco o zona de la lesión donde forman una matriz, preferiblemente con las células y/o principio activo embebidas.

55

La reacción de entrecruzamiento que ocurre entre los dos biopolímeros A y B modificados y obtenidos en las etapas (a) y (b), respectivamente, consiste en una cicloadición y se realiza mediante la estrategia sintética que se denomina “click-chemistry”. La estrategia “click-chemistry” está basada en reacciones que permiten el acoplamiento de bloques modulares de una manera selectiva y eficiente tanto en aplicaciones a pequeña escala como en procesos a gran escala. Las reacciones que pueden considerarse dentro de esta estrategia “click” deben cumplir una serie de requisitos bien definidos, como son los siguientes: debe ser modular, aplicable en un rango amplio de situaciones, de elevado rendimiento, generar como subproductos sustancias no tóxicas y debe ser estereoespecífica (no necesariamente enantioselectiva). Además, estas reacciones se deben poder llevar a cabo en condiciones suaves, a partir de productos

60

65

de partida fácilmente disponibles y en ausencia de disolventes orgánicos o en pequeñas cantidades de los mismos y los productos finales deben ser fáciles de aislar. Existen varios tipos de transformaciones que podrían incluirse dentro de la categoría de "click chemistry", pero sin duda la reacción de cicloadición de Huisgen 1,3-dipolar de alquinos y azidas catalizada por Cu(I), para dar lugar a 1,2,3 triazoles es el ejemplo más característico y utilizado de todas ellas. Por ello, preferiblemente, se utiliza la reacción de cicloadición de Huisgen 1,3-dipolar de alquinos y azidas catalizada por Cu(I), para dar lugar a 1,2,3 triazoles. Esta reacción presenta las ventajas de la facilidad de síntesis de los derivados alquino y azida, utilizados como reactivos preferidos en el método de la invención, su rápida cinética y su tolerancia a una gran variedad de grupos funcionales y condiciones de reacción. Además, esta reacción se puede llevar a cabo en presencia de grupos funcionales y con rendimientos prácticamente cuantitativos (Figura 3).

También es posible, según se demostrará posteriormente en los ejemplos, formar e hidrogel de la invención a través una reacción de entrecruzamiento entre los dos biopolímeros de tipo elastina mediante metodología "click chemistry" sin necesidad de utilizar ningún tipo de catalizador ni de sustancia que induzca o promueva la reacción a mayores de las modificaciones realizadas en los biopolímeros que van a formar el hidrogel. Para ello es necesario preparar, en la etapa (a) del método de la invención, el biopolímero A modificado de manera que porte grupos, preferiblemente alquinos, lo suficientemente reactivos como para que se produzca la reacción en medio acuoso y en un tiempo muy corto. Más concretamente se hace reaccionar el biopolímero A con aminas primarias con un ciclooctino como se muestra en la figura 4. La reacción de entrecruzamiento en este caso se representa en la figura 5. Por ello, en otra realización preferida del método de la invención, la etapa (c) se lleva a cabo en ausencia de Cu(I).

Como ya se ha mencionado, los biopolímeros que forman el hidrogel de la invención pueden ser administrados directamente en el tejido a tratar a través de su inyección, de manera que el hidrogel de la invención se formará *in situ*. Esta vía de administración presenta múltiples ventajas como la mínima incomodidad para el paciente, el uso de anestesia local, el más bajo costo, la fácil programación del procedimiento y la más precisa cantidad de material implantado, permitiendo el acceso a áreas del cuerpo que de otra manera son difícilmente accesibles. Así, el hidrogel de la invención puede ser utilizado como un implante, superando las limitaciones de los implantes de materiales biomédicos macroscópicos sólidos, los cuales requieren de procedimientos quirúrgicos convencionales invasivos, comúnmente asociados a un extenso daño tisular interno. Por ello, otro aspecto de la invención se refiere a un implante que comprende el hidrogel de la invención, de ahora en adelante "implante de la invención". Otro aspecto de la invención se refiere al uso del hidrogel de la invención para la elaboración o recubrimiento de un implante.

Este implante de la invención se adaptará mejor al tejido circundante, alcanzando un mejor contacto y adhesión al mismo. El implante de la presente invención puede presentar, por ejemplo aunque sin limitarnos, una superficie micropatroneada o ser procesado en nanofibras para aquellas aplicaciones en que tenga especial interés el guiado o confinamiento celular como puede ser en tejido nervioso.

Por otro lado, en aquellas aplicaciones clínicas en que es necesaria la utilización de un implante con una rigidez superior a la del hidrogel de la invención y en las que éstos generan problemas de rechazo o falta de integración del material en los tejidos circundantes, el hidrogel de la presente invención puede ser utilizado para recubrir eficazmente dichos implantes aportando sus características de biocompatibilidad y bioactividad.

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. El implante de la invención puede ser, pero sin limitarse, del tipo nanopartícula, micropartícula, microesfera o microcápsula.

Otro aspecto de la invención se refiere al uso del hidrogel de la invención o del implante de la invención para la elaboración de un medicamento, de ahora en adelante "medicamento de la invención".

El término "medicamento", tal y como se usa en esta memoria, hace referencia a cualquier sustancia usada para prevención, alivio, tratamiento o curación de enfermedades en el hombre y los animales. En el contexto de la presente invención se refiere a una composición que comprende el hidrogel o el implante de la invención.

El medicamento al que se refiere la presente invención puede ser de uso humano o veterinario. El "medicamento de uso humano" es toda sustancia o combinación de sustancias que se presente como poseedora de propiedades para el tratamiento o prevención de enfermedades en seres humanos o que pueda usarse en seres humanos o administrarse a seres humanos con el fin de restaurar, corregir o modificar las funciones fisiológicas ejerciendo una acción farmacológica, inmunológica o metabólica, o de establecer un diagnóstico médico. El "medicamento de uso veterinario" es toda sustancia o combinación de sustancias que se presente como poseedora de propiedades curativas o preventivas con respecto a las enfermedades animales o que pueda administrarse al animal con el fin de restablecer, corregir o modificar sus funciones fisiológicas ejerciendo una acción farmacológica, inmunológica o metabólica, o de establecer un diagnóstico veterinario.

En una realización preferida, el medicamento es para la liberación controlada de un principio activo, ya que el hidrogel de la invención es capaz de dosificar un principio activo de una manera sostenida y/o localizada en un tejido o entorno de células específico, como se verá en los ejemplos. El uso del medicamento de la invención para la liberación

controlada de fármacos se puede llevar a cabo en animales. Preferiblemente los animales son mamíferos. Más preferiblemente los mamíferos son humanos.

5 En otra realización preferida, el medicamento es para la administración de células, es decir, preferiblemente el medicamento de la invención es un medicamento de terapia celular somática.

Se entiende por "terapia celular somática" la utilización de células somáticas vivas, tanto autólogas, como alogénicas o xenogénicas, cuyas características biológicas pueden haber sido alteradas como resultado de su manipulación, para obtener un efecto terapéutico, de diagnóstico o preventivo, por medios metabólicos, farmacológicos o inmunológicos. Entre los medicamentos de terapia celular somática se encuentran, por ejemplo, pero sin limitarse: células manipuladas para modificar sus propiedades inmunológicas, metabólicas o funcionales de otro tipo en aspectos cualitativos o cuantitativos; células clasificadas, seleccionadas y manipuladas, que se someten posteriormente a un proceso de fabricación con el fin de obtener el producto terminado; células manipuladas y combinadas con componentes no celulares (por ejemplo, matrices o productos sanitarios biológicos o inertes) que ejercen la acción pretendida en principio en el producto acabado; derivados de células autólogas expresadas *ex vivo (in vitro)* en condiciones específicas de cultivo; o células modificadas genéticamente o sometidas a otro tipo de manipulación para expresar propiedades funcionales homólogas o no homólogas anteriormente no expresadas.

20 En una realización más preferida, el medicamento es para la administración combinada de células y un principio activo.

Otro aspecto de la invención se refiere a una composición, de ahora en adelante "primera composición de la invención", que comprende un biopolímero A de tipo elastina, donde dicho biopolímero comprende:

a) al menos 3 repeticiones del péptido SEQ ID NO: 1 (YPY'XY''), donde:

X se selecciona de entre de ente L-lisina, L-serina, L-tirosina, L-treonina, L-cisteina, Ácido Aspártico, Ácido Glutámico, L-arginina, L-asparragina y L-Glutamina,
Y' es glicina o L-Alanina,
Y y Y'' son iguales o diferentes y son cualquier aminoácido natural, excepto L-prolina, y son distintos a X, y

b) al menos una repetición del péptido con SEQ ID NO: 2 (YPY'Y''Y''').

Otro aspecto de la invención se refiere a una composición, de ahora en adelante "segunda composición de la invención", que comprende un biopolímero B de tipo elastina, donde dicho biopolímero comprende:

a) al menos 3 repeticiones del péptido SEQ ID NO: 1 (YPY'XY''), donde:

X se selecciona de entre de ente L-lisina, L-serina, L-tirosina, L-treonina, L-cisteina, Ácido Aspártico, Ácido Glutámico, L-arginina, L-asparragina y L-Glutamina,
Y' es glicina o L-Alanina,
Y y Y'' son iguales o diferentes y son cualquier aminoácido natural, excepto L-prolina, y son distintos a X, y

b) al menos una repetición del péptido con SEQ ID NO: 2 (YPY'Y''Y''').

45 La primera y segunda composición de la invención pueden comprender además células, excipientes, principios activos y/o vehículos farmacéuticamente aceptables.

El término "excipiente" hace referencia a una sustancia que ayuda a la absorción de los elementos de las composiciones de la invención, estabiliza dichos elementos, activa o ayuda a la preparación de las composiciones en el sentido de darles consistencia. Así pues, los excipientes podrían tener la función de mantener los ingredientes unidos, como por ejemplo es el caso de almidones, azúcares o celulosas, la función de endulzar, la función de colorante, la función de protección de la composición, como por ejemplo, para aislarla del aire y/o la humedad, la función de relleno de una pastilla, cápsula o cualquier otra forma de presentación, como por ejemplo, es el caso del fosfato de calcio dibásico, la función desintegradora para facilitar la disolución de los componentes y su absorción, sin excluir otro tipo de excipientes no mencionados en este párrafo.

El "vehículo farmacéuticamente aceptable", al igual que el excipiente, es una sustancia que se emplea en la composición para diluir cualquiera de los componentes comprendidos en ella hasta un volumen o peso determinado. El vehículo farmacológicamente aceptable es una sustancia inerte o de acción análoga a cualquiera de los elementos comprendidos en las composiciones de la presente invención. La función del vehículo es facilitar la incorporación de otros elementos, permitir una mejor dosificación y administración o dar consistencia y forma a la composición. Cuando la forma de presentación es líquida, el vehículo farmacológicamente aceptable es el diluyente.

65 Las composiciones de la presente invención pueden formularse para su administración a un animal, preferiblemente a un mamífero, incluyendo al hombre, en una variedad de formas conocidas en el estado de la técnica. Así, pueden estar,

aunque sin limitarse, en soluciones acuosas o no acuosas, en emulsiones o en suspensiones. Preferiblemente, la primera y segunda composición de la invención se encuentran en solución acuosa.

Las composiciones a las que se refiere la presente invención pueden administrarse a un animal, incluyendo un mamífero y, por tanto, al hombre, en una variedad de formas, aunque preferiblemente se administran de forma parenteral, incluyendo pero sin limitarnos, intraperitoneal, intravenosa, intradérmica, intraespinal, intraestromal, intraarticular, intrasinovial, intratecal, intralesional, intraarterial, intracardiaca, intramuscular, intraósea, intranasal, intracraneal, subcutánea, intraorbital, intracapsular, tópica o mediante parches transdérmicos.

Por ello, otro aspecto de la invención se refiere a un kit que comprende la primera y segunda composición de la invención. Preferiblemente, este kit comprende además todos los elementos necesarios para llevar a cabo la inyección de ambas composiciones en el cuerpo humano o animal.

Otro aspecto de la invención se refiere a una composición farmacéutica que comprende el hidrogel de la invención, de ahora en adelante "composición farmacéutica de la invención".

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. Los siguientes ejemplos y figuras 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 reacción de funcionalización de los biopolímeros con grupos azida. En primer lugar se genera "in situ" la azida triflúrica TfN_3 , a partir de la correspondiente azida de sodio menos reactiva. En una segunda etapa la azida triflúrica actúa como reactivo nucleófilo dando lugar a una reacción de sustitución sobre el grupo amino.

Fig. 2. Muestra un esquema de la reacción de amidación de los grupos amino libres del biopolímero con anhídrido pentinoico, en presencia de dicitlohexilcarbodiimida como catalizador.

Fig. 3. Muestra un esquema de formación del hidrogel mediante reacción de Huisgen a partir de dos biopolímeros, uno de los cuales contiene los restos alquinos y el otro los restos azidas. Los puntos negros representan los puntos de entrecruzamiento donde se forman los triazoles.

Fig. 4. Muestra un esquema de reacción de acoplamiento del grupo ciclooctino al ELR.

Fig. 5. Muestra un esquema de la reacción de entrecruzamiento sin agentes inductores o catalizadores.

Fig. 6. Muestra la caracterización química del biopolímero A. (A) Análisis de espectroscopía de infrarrojos (FTIR-ATR) del biopolímero A en el cual se muestran las señales características de los grupos amido ($\sim 1700\text{ cm}^{-1}$) presentes en los polímeros proteicos diseñados. (B) Análisis de espectroscopía de masas (MALDI-ToF) del biopolímero A en el cual se muestra el valor de su Masa Molecular experimental de 60422 Da, siendo el teórico 60362 Da y la diferencia entre ambos atribuible al error de medida. También se observa el carácter monodisperso de la molécula apareciendo sólo un estrecho pico. (C) Análisis de espectroscopía de resonancia magnético nuclear de protón del biopolímero A. (D) Electroforesis en gel de acrilamida del biopolímero A con el marcador de peso molecular en la calle de la derecha y el biopolímero A en la calle de la izquierda. Los pesos moleculares se indican en kilodaltons (kDa).

Fig. 7. Muestra la caracterización química del biopolímero A-alquino. (A) Análisis de espectroscopía de infrarrojos (FTIR-ATR) del biopolímero A alquino en el cual se muestran las señales características de los grupos alquino ($\sim 3300\text{ cm}^{-1}$) presentes en los polímeros proteicos diseñados. (B) Análisis de espectroscopía de masas (MALDI-ToF) del biopolímero A-alquino en el cual se muestra el valor de su Masa Molecular experimental de 62560 Da, siendo el peso molecular teórico del biopolímero sin derivatizar 60362 Da. La diferencia entre ambos permite asignar una conversión total de los grupos amino libres del biopolímero A. También se observa el carácter monodisperso de la molécula apareciendo sólo un estrecho pico. (C) Análisis de espectroscopía de resonancia magnético nuclear de protón del biopolímero A-alquino que muestra las señales características del grupo alquino a 2,25; 2,75 y 3,0, cuya integración permite atribuir un grado de acoplamiento del 100%. (D) Electroforesis en gel de acrilamida del biopolímero A-alquino con el marcador de peso molecular en la calle de la izquierda y el biopolímero A-alquino en la calle de la derecha. Los pesos moleculares se indican en kilodaltons (kDa).

Fig. 8. Muestra la caracterización química del biopolímero B-azida. (A) Análisis de espectroscopía de infrarrojos (FTIR-ATR) del biopolímero B-azida en el cual se muestran las señales de absorción características de los grupos amido de los polímeros proteicos ($\sim 1700\text{ cm}^{-1}$) junto con la señal característica del nuevo grupo azido a 2100 cm^{-1} . (B) Análisis de espectroscopía de masas (MALDI-ToF) del biopolímero B-azida en el cual se muestra el valor de su Masa Molecular experimental de 60848 Da, siendo el peso molecular teórico del biopolímero sin derivatizar 60362 Da. La diferencia entre ambos permite asignar una conversión total de los grupos amino libres del biopolímero B. También se observa el carácter monodisperso de la molécula apareciendo sólo un estrecho pico. (C) Análisis de espectroscopía de resonancia magnético nuclear de protón del biopolímero B-azida. (D) Electroforesis en gel de acrilamida del biopolímero

B-azida con el marcador de peso molecular en la calle de la izquierda y el biopolímero B-azida en la calle de la derecha. Los pesos moleculares se indican en kilodaltons (kDa).

- 5 **Fig. 9. Muestra el análisis de espectroscopía de infrarrojos FTIR-ATR de los hidrogeles de los biopolímeros A-alquino, B-azida con concentraciones poliméricas de 25, 50, 100 y 150 mg/ml.** Se puede observar cómo la señal de absorción característica del grupo azido a 2100 cm^{-1} no está presente en el hidrogel de 50 mg/ml, mostrándonos la ausencia de grupos azido libres en el mismo. La intensidad de la banda es ligeramente superior para el de 100 mg/ml y mucho más intensa para el de 150 mg/ml, indicándonos la existencia de más grupos azida libre en este último caso y, por tanto, una menor efectividad de la reacción “click”.
- 10 **Fig. 10. Muestra el análisis de espectroscopía de infrarrojos FTIR-ATR del hidrogel de los biopolímeros B-alquino, A-azida con una concentración polimérica de 50 mg/ml.** Se puede observar la ausencia de la señal de absorción característica del grupo azido a 2100 cm^{-1} en el hidrogel indicándonos un entrecruzamiento total en el mismo.
- 15 **Fig. 11. Muestra el análisis de espectroscopía de infrarrojos FTIR-ATR del hidrogel de los biopolímeros A-alquino, A-azida con una concentración polimérica de 50 mg/ml.** Se puede observar cómo la señal de absorción característica del grupo azido a 2100 cm^{-1} ha desaparecido en el hidrogel indicándonos un entrecruzamiento total entre los grupos azido y alquinilo presentes en los biopolímeros.
- 20 **Fig. 12. Muestra el análisis de espectroscopía de infrarrojos FTIR-ATR del hidrogel de los biopolímeros A-alquino, C-azida con una concentración polimérica de 50 mg/ml.** Se puede observar cómo la señal de absorción característica del grupo azido a 2100 cm^{-1} ha desaparecido en el hidrogel indicándonos un entrecruzamiento total entre los grupos azido y alquinilo presentes en los biopolímeros.
- 25 **Fig. 13. Muestra el análisis de $^1\text{H-RMN}$ (dms o -d 6) del biopolímero B-octino.**
- Fig. 14. Muestra fotografías ópticas de hidrogeles obtenidos vía click con diferente composición y concentración polimérica.**
- 30 **Fig. 15. Muestra las curvas de liberación acumulativa de insulina para tres hidrogeles obtenidos con los biopolímeros A-alquino y B-azida y para las concentraciones A (50 mg/mL), B (100 mg/mL) y C (150 mg/mL).**
- Fig. 16. Muestra fotografías de imágenes del microscopio electrónico de bajo vacío de los hidrogeles de los biopolímeros A-alquino, B-azida con concentraciones poliméricas de 25 mg/ml (A), 50mg/ml (B), 100 mg/ml (C) y 150 mg/ml (D).**
- 35 **Fig. 17. Muestra las curvas de liberación acumulativa de dexametasona para tres hidrogeles obtenidos con los biopolímeros A-alquino y B-azida y para las concentraciones A (50mg/mL), B (100mg/mL) y C (150mg/mL).**
- 40 **Fig. 18. Muestra la fotografía de una placa de cultivo en la cual se han formado los hidrogeles.** Se aprecia el aspecto macroscópico de los hidrogeles depositados sobre el soporte (pocillos 3 y 4) que es de material traslúcido.
- Fig. 19. Muestra microfotografías del resultado de la tinción LIVE/DEAD® de cultivos celulares a tiempo 4 y 24 horas de incubación.** En la columna A se muestran campos de cultivos obtenidos con la mezcla A-alquino & B-azida (50 mg/mL), mientras que la columna B muestra campos de cultivos obtenidos con la de la mezcla A-octino & B-azida (100 mg/mL).
- 45 **Fig. 20. Muestra fotografías en microscopio de fluorescencia de los diferentes tipos celulares tras la tinción del núcleo y del citoesqueleto para las células cultivadas en hidrogeles A-alquino & B-azida, A-alquino & C-azida de 50mg/mL o en A-octino & B-azida, A-octino & C-azida de 100mg/mL:** fila A fibroblastos, B endoteliales y progenitoras mesenquimales en la C.
- 50 **Fig. 21. Muestra la relación entre viabilidad y concentración celular de células crecidas en los hidrogeles A-alquino & B-azida de la invención.** En las gráficas A y B se relacionan el número de células metabólicamente activas en el tiempo de cultivo en hidrogeles de concentraciones crecientes (gráfica A: 75-150 mg/mL; gráfica B 12,5-50 mg/mL). En el cuadro C se muestran la morfología de las células presentes en los hidrogeles.
- 55 **Fig. 22. Muestra la viabilidad y bioactividad de los hidrogeles de la invención como soporte para el cultivo celular.** En las gráficas se relacionan el número de células metabólicamente activas en el tiempo de cultivo. A: fibroblastos cultivados en hidrogeles A-alquino & B-azida y A-alquino & A-azida de concentración 50 y 100 mg/mL. B: endoteliales cultivadas en hidrogeles A-alquino & B-azida A-alquino & C-azida y A-alquino & A-azida de concentración 50 mg/mL.
- 60 **Fig. 23. Muestra la viabilidad y proliferación celular de células crecidas en los hidrogeles de la invención.** En la gráfica se relacionan el número de células metabólicamente activas en el tiempo de cultivo. Se muestra el crecimiento
- 65

de las células progenitoras mesenquimales embebidas en el hidrogel A-alquino & B-azida 50 mg/mL, respecto a las crecidas sobre plástico para cultivos *in vitro*.

5 **Fig. 24. Muestra microfotografías de cultivo de células humanas progenitoras mesenquimales incluidas en hidrogel biocompatible tipo *click* A-alquino & B-azida a 1, 15, 35 y 60 días de incubación, tras fijación y tinción del citoesqueleto y del núcleo.**

Fig. 25. Muestra un esquema del proceso de “replica moulding” seguido.

10 **EJEMPLOS DE REALIZACIÓN**

A continuación se ilustrará la invención mediante unos ensayos realizados por los inventores, que ponen de manifiesto la eficiencia del hidrogel de la invención para el crecimiento celular y para la liberación controlada de fármacos, así como del método de la invención para obtener el hidrogel de la invención. Muestran también la síntesis de los dos biopolímeros de tipo elastina, así como las características fisicoquímicas y biológicas de los hidrogeles de la invención formados a partir de éstos. Estos ejemplos específicos que se proporcionan sirven para ilustrar la naturaleza de la presente invención y se incluyen solamente con fines ilustrativos, por lo que 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.

20 **EJEMPLO 1. OBTENCIÓN DE BIOPOLÍMEROS PROTEICOS RECOMBINANTES TIPO ELASTINA.**

1.1. Expresión y purificación de los polímeros.

25 Tabla 1. Composiciones de los biopolímeros obtenidos mediante técnicas recombinantes utilizados en la invención. Todos ellos contienen lisinas, que es el aminoácido utilizado para derivatizarlos a través de la amina y para obtener los precursores de los hidrogeles, es decir los derivados alquinos, azidas y octinos de los biopolímeros.

<i>RECOMBINÁMEROS</i>	<i>SECUENCIA</i>	<i>Apodo</i>	<i>Apodo tras derivatización con anhídrido pentinoico</i>	<i>Apodo tras derivatización con azida triflica</i>	<i>Apodo tras derivatización con ciclooctino</i>
VK24 (60562Da)	SEQ ID NO: 10 MESLLP (VGVP VGVP GKGV GVGV GGV GVGV G) ₂₄ -V	A	A-alquino	A-azida	A-octino
RGD6 (60661 Da)	SEQ ID NO: 11 MGSSHHHHHS SGLVPRGSHMES LLP [[<u>(VPGIG)₂(VPGK G)(VPGIG)₂]</u> <u>AVTGRGDSPASS</u> [[<u>(VPGIG)₂(VPGK) (VPGIG)₂]</u>] ₆ -V	B	B-alquino	B-azida	B-octino
REDVx10(80925Da)	SEQ ID NO: 12 MESLLP [[<u>(VPGIG)₂(VPGK) (VPGIG)₂EEIQIG</u>	C	C-alquino	C-azida	

	HIPREDVDYHLYP (VPGIG) ₂ (VPGKG) (VPGIG) ₂ (VGVAP G) ₃] ₁₀ -V				
PIT2 (66506 Da)	SEQ ID NO: 13 MESLLP [(VPGIG) ₂ (VPGKG) <u>(VPGIG)₂EEIQIG</u> HIPREDVDYHLYP (VPGIG) ₂ (VPGKG) (VPGIG) ₂] ₁₀	D	D-alquino	D-azida	

EJEMPLO 2. CARACTERIZACIÓN DE LOS BIOPOLÍMEROS TIPO ELASTINA.

5 Para caracterizar los biopolímeros tipo elastina 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. También se realizó una espectrometría de masas MALDI-TOF en un espectrómetro modelo Q-Star para calcular exactamente el peso molecular del polímero, un espectro de resonancia magnética nuclear de protón realizado en un espectrómetro modelo Bruker ARX300 y un espectro de infrarrojo (FT-IR) utilizando un espectrofotómetro Cary 50. La composición de aminoácidos se determinó mediante HPLC con detección UV usando un sistema de gradiente HPLC modelo WATERS 600 con un detector WATERS 2487, y se realizó calorimetría diferencial de barrido (DSC) de soluciones acuosas del material en una concentración de 50 mg/ml en un equipo Mettler Toledo 822^o DSC, para obtener la temperatura de transición inversa del polímero.

Biopolímero A (727 aminoácidos)

15 Secuencia aminoacídica SEQ ID NO: 10. Codificado por la secuencia nucleotídica SEQ ID NO: 14.

La composición de aminoácidos teórica y la obtenida mediante HPLC se presentan en la Tabla 2.

20 Tabla 2. Análisis de la composición de aminoácidos del biopolímero A.

		Ser	Glx	Gly	Pro	Val	Met	Lys	Ile
Análisis aminoácidos	Teórico	1	1	288	145	266	1	24	2
	Experimental	1,56	3,02	294,66	144,74	257,75	1,75	25,84	3,26

25 El rendimiento de la producción fue de 240 mg/L. El Peso Molecular teórico para el polímero A es de 60562 Da y se estimó experimentalmente por electroforesis en gel de poliacrilamida y por espectrometría de masas MALDI-TOF resultando ser de 60422 Da. Dicho espectro, así como el espectro de IR y de RMN obtenido para el biopolímero A quedan recogidos en la figura 6. La Temperatura de transición obtenida mediante DSC en MQ a pH 8 fue de 54,3^o C.

Biopolímero B (699 aminoácidos)

30 Secuencia aminoacídica SEQ ID NO: 11. Codificado por la secuencia nucleotídica SEQ ID NO: 15.

La composición de aminoácidos teórica y la obtenida mediante HPLC con detección UV se presentan en la Tabla 3.

Tabla 3. Análisis de la composición de aminoácidos del biopolímero B.

		Asp	Ser	Glu	Gly	His	Arg	Thr	Ala	Pro	Val	Met	Lys	Ile	Leu
Análisis aminoácidos	Teórico	6	24	1	255	7	7	6	12	128	128	2	24	96	3
	Experimental	7,77	18,08	1,31	248,97		6,63	6,29	13,56	130,97	128,66	n.d.	19,05	96,84	3,08

35 El rendimiento de la producción fue de 450 mg/L. El Peso Molecular teórico para el polímero B es de 60.661 Da y se estimó experimentalmente por electroforesis en gel de poliacrilamida y por MALDI-TOF resultando ser de 60.556 Da.

Dicho espectro, así como el espectro de IR y de RMN obtenido para el biopolímero B confirman su composición. La Temperatura de transición obtenida mediante DSC en MQ a pH 7,5 fue de 30,6° C.

Biopolímero C (877 aminoácidos)

Secuencia aminoacídica SEQ ID NO: 12. Codificado por la secuencia nucleotídica SEQ ID NO: 16.

La composición de aminoácidos teórica y la obtenida mediante HPLC con detección UV se presentan en la Tabla 4.

Tabla 4. Análisis de la composición de aminoácidos del biopolímero C.

		Asp	Ser	Glu	Ph e	Gly	His	Tyr	Arg	Thr	Ala	Pro	Val	Me t	Lys	Ile	Leu
Análisis aminoácidos	Teórico	20	1	41	0	210	20	20	10	0	0	121	111	1	20	110	12
	Experi- menta l	24,5 2	2,7 6	45,4 2	1,0 7	208,9 1	24, 1	20,2 5	13,8 6	2,5 8	5,3 6	119,7 9	109,3 7	0,3 8	22,9 5	106, 3	16,5 7

El rendimiento de la producción fue de 410 mg/L. El Peso Molecular teórico para el polímero C es de 80925 Da y se estimó experimentalmente por electroforesis en gel de poliacrilamida y por espectrometría de masas MALDI-TOF resultando ser de 80804 Da. Dicho espectro, así como el espectro de IR y de RMN obtenido para el biopolímero C confirman su composición. La Temperatura de transición obtenida mediante DSC en MQ a pH 7,3 fue de 31,2 °C.

EJEMPLO 3. OBTENCIÓN DE HIDROGELES INYECTABLES A PARTIR DE LOS BIOPOLÍMEROS PROTEICOS RECOMBINANTES TIPO ELASTINA A Y B.

Se obtuvieron hidrogeles con la metodología descrita anteriormente a partir de los biopolímeros A y B.

3.1 Obtención del hidrogel a partir del biopolímero A modificado como alquino-A y el biopolímero B como azida-B.

La obtención del biopolímero A-alquino se lleva a cabo por reacción de amidación de los grupos amino en posición gamma de los aminoácidos lisina presentes en el biopolímero A, con anhídrido pentinoico, en presencia de EDAC como catalizador, utilizando trifluoroetanol (TFE) como disolvente. La relación molar utilizada es 10 equivalentes de anhídrido pentinoico y 5 equivalentes de EDAC por mol de aminas libres presentes en el biopolímero, trabajando con una concentración polimérica de 100 mg/ml. La reacción tiene lugar a temperatura ambiente durante 2-3 días, con un buen rendimiento de la reacción (82-87%). La caracterización del biopolímero A-alquino se hizo por espectroscopía de masas (MALDI-TOF), RMN y FTIR, mostrando una conversión total de todos los grupos amino libre presentes en el biopolímero (Figura 7). La introducción de los restos alquínilo en el biopolímero tiene el efecto esperado en su temperatura de transición, disminuyendo a 23-24°C en todo el rango de pH ya que se han sustituido restos amino, más polares, por alquínilos que son menos polares.

La obtención del biopolímero B-azida se lleva a cabo por transformación de los aminoácidos lisina que poseen grupos amino en la posición gamma, en grupos azida, por reacción de sustitución utilizando azida tríflica generada "in situ" como reactivo nucleófilo, obteniéndose un rendimiento de la reacción del 85%. La caracterización del biopolímero B-azida se hizo por MALDI-TOF, FTIR, RMN (Figura 8), análisis de aminoácidos y DSC.

El espectro de infrarrojo (FTIR-ATR) muestra la señal característica de los grupos azida a frecuencias de 2.100 cm⁻¹ mientras que en el espectro de IR del biopolímero precursor no aparecía dicha señal.

Se corrobora el éxito y alcance de la reacción de modificación del biopolímero B examinando el ensayo de análisis de aminoácidos realizado, donde se observa una importante disminución del número de aminoácidos de lisina mientras que el resto de los aminoácidos permanecen inalterados. De esta manera, deducimos que se han modificado los grupos amino de dichas lisinas, transformándose en grupos azida, estimando que se han transformado un 54% de las lisinas (Tabla 5)

Tabla 5. Análisis de la composición de aminoácidos del biopolímero azida-B.

		Asp	Ser	Glu	Gly	Arg	Thr	Ala	Pro	Val	Met	Lys	Ile	Leu
Análisis amino- ácidos	Teórico	6	24	1	255	7	6	12	128	128	2	24	96	3
	Experi- mental	4,83	20,33	1,04	252,67	7,31	5,71	11,94	131,42	128,55	n.d.	8,49	97,74	4,62

La transición inversa con la temperatura del biopolímero B-azida ocurre a una temperatura de 22,2°C e inferior a la del biopolímero B de 24,2°C en 2° C. Este comportamiento es debido a la introducción de un grupo fuertemente apolar, como es el grupo azida, frente al grupo amino de partida.

5

Se prepararon muestras en agua de los biopolímeros de 25, 50, 100 y 150 mg/ml de concentración total de los biopolímeros A-alquino y B-azida (en cantidades equivalentes). Se llevó a cabo la reacción de formación del hidrogel “*via click chemistry*” mediante la generación *in situ* del catalizador Cu(I) generado por reducción del ión Cu(II) en presencia de ascorbato, trabajando con una concentración de cobre de 3,6 mmol/L y de ascorbato sódico de 9,49 mmol/L y a baja temperatura, para evitar la precipitación de los biopolímeros y el inicio de la reacción click. Se deposita la mezcla a 4°C sobre molde de PDMS y tras 10 minutos se procede a su calentamiento a 37°C, constatando la formación del hidrogel de forma casi instantánea.

10

La caracterización física del hidrogel 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 mínimo de 500 µm. El rango de viscoelasticidad lineal se determinó a 1 Hz de frecuencia seleccionándose dentro de este rango una deformación del 1.0%.

15

En la Tabla 6 pueden observarse los valores alcanzados del módulo elástico, módulo viscoso, la viscosidad compleja y el ángulo de desfase que indica la relación entre la elasticidad y la viscosidad compleja, para las distintas concentraciones ensayadas. De dichos valores se deduce que, las propiedades mecánicas del material aumentan al aumentar la concentración polimérica. Para la muestra de 25 mg/ml el valor de G' es de 2.9 kPa y para la de 150 mg/ml de 8.7. En este sentido, el análisis por FT-IR de los hidrogeles obtenidos liofilizados muestra una disminución drástica de la banda de azida característica del biopolímero de partida a 2100 cm⁻¹ y que se está consumiendo en la reacción de entrecruzamiento (Figura 9).

20

25

Tabla 6 (página siguiente). Datos de inyectabilidad de disoluciones de los biopolímeros alquino-A y azida-B utilizados para preparar hidrogeles con concentraciones de 25, 50, 100 y 150 mg/ml. Datos reológicos y de humectabilidad de los hidrogeles generados.

Concentración (mg/ml)	G' (kPa)	G'' (kPa)	Ángulo de desfase	Viscosidad compleja η^* (kPa.s)	Grado de hinchamiento (37°C)	Inyectabilidad		
						G21	G26	G27
25	2.9	0.4	8.2	0.5	3.6	Muy fácil	Muy fácil	Fácil
50	4.1	0.4	5.5	0.7	2.7	Muy fácil	Muy fácil	Fácil
100	6.7	0.6	4.9	1.0	1.7	Muy fácil	Fácil	Difícil
150	8.7	1.8	11.64	1.4	1.6	Fácil	Normal	Difícil

En la tabla 6, se recogen también los valores del grado de hinchamiento (peso hidrogel hidratado (Ws)/peso hidrogel liofilizado (Wd)) de los hidrogeles con estas concentraciones poliméricas, tras dos días de incubación en agua milliQ a 37°C. Asimismo, quedan reflejados los datos acerca de la inyectabilidad de las disoluciones con agujas de diferentes diámetros. Se ensayó con agujas G21, G26 y G27, observándose que hasta una concentración de 100 mg/ml las muestras son fácilmente inyectables con agujas de diámetros de hasta G26 mientras que las de 150 mg/ml se inyectaban con cierta dificultad con agujas de dicho diámetro, inyectándose fácilmente con agujas tipo G21.

Como comprobación de la eficacia del sistema para aquellas aplicaciones en que existe una presencia importante de fluidos, se realizó la inyección de estos biopolímeros sobre una disolución tampón PBS pH 8 a 37°C. Se observó cómo incluso en estas condiciones, se forma el hidrogel al introducirse la mezcla de los biopolímeros en la disolución y alcanzar la temperatura de la misma. Una vez inyectados volúmenes de la mezcla de los biopolímeros precursores del hidrogel de aproximadamente un mililitro, es posible sacar el hidrogel generado como una masa coherente y de un volumen visualmente semejante al que se ha inyectado, sin apreciarse pérdida de muestra o dispersión de la misma en el baño de agua.

Por tanto, con este modelo de dos componentes conseguimos una matriz por reacción de entrecruzamiento covalente en medio acuoso, sin necesidad de añadir reactivos entrecruzantes ni disolventes orgánicos y con una velocidad de entrecruzamiento elevada, a diferencia de otros inyectables de dos componentes que necesitan un disolvente orgánico, reactivos orgánicos que actúen de entrecruzantes y donde la reacción de entrecruzamiento es mucho más lenta.

3.2 Obtención del hidrogel a partir del biopolímero A modificado como azida-A y el biopolímero B modificado como alquino-B.

El recombinámero B modificado con grupos alquino se obtiene por reacción de amidación, catalizada por EDAC y siguiendo el procedimiento del ejemplo 3.1. La relación molar utilizada es 10 equivalentes de anhídrido pentanoico y 5 equivalentes de EDAC por mol de aminas libres presentes en el biopolímero, trabajando con una concentración polimérica de 100 mg/ml. La reacción tiene lugar a también a temperatura ambiente durante 2-3 días, con un rendimiento de la reacción del 82-87%. La caracterización del biopolímero B-alquino, se hizo mediante MALDI-TOF, RMN y DSC, comprobando que el porcentaje de sustitución de los grupos amino libre por restos alquino es del 100%.

El biopolímero A-azida se obtuvo siguiendo el protocolo descrito anteriormente, siendo caracterizado por MALDI-TOF, FT-IR y DSC y análisis de aminoácidos, comprobando que el porcentaje de sustitución de los grupos amino libre por restos azidas era del 62%. La reacción se llevó a cabo con buen rendimiento químico (89%).

Tal y como se explicó en el ejemplo 3.1, se llevó a cabo la reacción de formación del hidrogel *via click* mediante la generación *in situ* del catalizador Cu(I) generado por reducción del ión Cu(II) (3,6 mmol/L) en presencia de ascorbato (9,49 mmol/L), a partir de los biopolímeros A-azida y B-alquino en una concentración polimérica final de 50mg/ml. Se consiguió un eficaz entrecruzamiento tal y como se puede constatar analizando la banda de 2.100 cm^{-1} correspondiente a azidas que ha desaparecido completamente (Figura 10).

En la Tabla 7 pueden observarse los valores alcanzados del módulo elástico, módulo viscoso, la viscosidad compleja y el ángulo de desfase para las dos composiciones ensayadas, así como su grado de hinchamiento a 37°C.

Tabla 7. Datos reológicos y de humectabilidad de hidrogeles de concentración 50 mg/ml en los que se ha intercambiado la naturaleza del biopolímero con grupos azida y alquino

Composición 50 mg/ml	G' (kPa)	G'' (kPa)	Ángulo de fase	Viscosidad compleja η^* (kPa.s)	Grado de hinchamiento (37°C)
Alquino-A /azida-B	4.1	0.4	5.5	0.7	2.7
Alquino-B /azida-A	4.3	0.2	2.7	0.7	2.5

3.3. Obtención de hidrogeles inyectables a partir del biopolímero proteico recombinante tipo elastina A modificados tanto como azida-A y como alquino-A.

Es posible obtener hidrogeles que no contengan una secuencia de adhesión celular mediante la utilización exclusivamente del biopolímero A. Para ello se usaron dos derivados de dicho polímero, el A-alquino y el A-azida modificados tal y como se ha descrito previamente para que reaccionen *via click chemistry*, en condiciones fisiológicas.

La reacción se ha llevado a cabo en agua, así como en tampón salino y en medio de cultivo. Se preparan dos disoluciones: una del biopolímero A-alquino con sulfato de cobre (II) y otra de biopolímero A-azida con ascorbato sódico en concentraciones tales que la mezcla de ambas proporcione una concentración final de polímero de 50 mg/ml, una concentración de cobre (3,6 mmol/L) y de ascorbato sódico de (9,49mmol/L). Las dos disoluciones se mezclaron con ayuda de una jeringa mezcladora a 4°C, sobre un molde de PDMS. Tras 10 minutos, se procede a su calentamiento a 37°C, constatando la formación del hidrogel de una forma casi instantánea.

El análisis del espectro de FT-IR del hidrogel obtenido liofilizado muestra la “ausencia” de la señal característica del grupo azida, siendo un indicio del elevado grado de entrecruzamiento covalente obtenido (Figura 11).

5 La determinación de las propiedades mecánicas de los geles obtenidos presentan valores del módulo viscoelástico de 4.7 kPa a 37°C, un ángulo de fase de 2.9 y una viscosidad compleja de 0.9 kPa•m, así como un grado de hinchamiento a esta temperatura de 2.3 tras dos días en agua MilliQ a 37°C.

10 Tal y como se demostró en el ejemplo 1, la inyección de estos biopolímeros sobre agua o sobre una disolución PBS pH 8 a 37°C, provoca la gelificación instantánea de las soluciones poliméricas por entrecruzamiento covalente via “click”, al introducirse la mezcla en la solución acuosa y alcanzar la temperatura de ésta.

3.4. Obtención de hidrogeles inyectables a partir de los biopolímeros proteicos recombinantes tipo elastina A y C.

15

Es posible obtener hidrogeles que contengan una secuencia de adhesión celular específica para células endoteliales, así como una secuencia específica de acción de proteasas, mediante la utilización de los biopolímeros A y C. Para ello utilizaremos dos derivados de dichos polímeros el A-alquino y el C-azida modificados tal y como se ha descrito previamente para que reaccionen vía *click chemistry*, en condiciones fisiológicas.

20

La reacción se ha llevado a cabo en agua, así como en tampón salino y en medio de cultivo. Se preparan dos disoluciones: una del biopolímero A-alquino con sulfato de cobre (II) y otra de biopolímero C-azida con ascorbato sódico en concentraciones tales que la mezcla de ambas proporcione una concentración final de polímero de 50 mg/ml, una concentración de cobre (3,6 mmol/L) y de ascorbato sódico de (9,49mmol/L). Las dos disoluciones se mezclaron con ayuda de una jeringa mezcladora a 4°C, sobre un molde de PDMS. Tras 10 minutos, se procede a su calentamiento a 25 37°C, constatando la formación del hidrogel de una forma casi instantánea.

25

El análisis del espectro de FT-IR del hidrogel obtenido liofilizado muestra la “ausencia” de la señal característica del grupo azida, siendo un indicio del elevado grado de entrecruzamiento covalente obtenido (Figura 12).

30

Nuevamente demostramos que con este modelo de dos componentes conseguimos una matriz por reacción de entrecruzamiento covalente en medio acuoso, sin necesidad de añadir reactivos entrecruzantes ni disolventes orgánicos y con una velocidad de entrecruzamiento elevada, biodegradable y que contiene una secuencia específica de adhesión celular.

35

La determinación de las propiedades mecánicas de los geles obtenidos presentan valores del módulo viscoelástico de 5.7 kPa a 37°C, con ángulos de fase de 6.6 y una viscosidad compleja de 0.6 kPa•m.

40

Tal y como se demostró en el ejemplo 3.1, la inyección de estos biopolímeros sobre agua o sobre una disolución PBS pH 8 a 37°C, provoca la gelificación instantánea de las soluciones poliméricas por entrecruzamiento covalente via “click”, al introducirse la mezcla en la solución acuosa y alcanzar la temperatura de ésta.

3.5. Obtención de hidrogeles inyectables a partir de los biopolímeros proteicos recombinantes mediante “click-chemistry” sin cobre u otra sustancia añadida que induzca la reacción de entrecruzamiento.

45

Para la obtención de hidrogeles sin la utilización de ningún agente inductor se utilizaron los biopolímeros A-octino y B-octino que se tienen que preparar previamente. Se disuelve el ELR correspondiente en dimetil formamida (DMF) y sobre esta disolución se añade otra del derivado de ciclooctino en DMF y se deja agitando a temperatura ambiente durante 48 horas. Transcurrido este tiempo se añade Et₂O (proporción 7:1 respecto al volumen de crudo de reacción) apareciendo un precipitado blanco que es el polímero ya modificado.

50

Se deja a 4 °C durante 15 minutos para favorecer el total precipitado del polímero modificado, se centrifuga a 4 °C durante 15 minutos a 10000 rpm y se decanta el sobrenadante. El precipitado se lava con acetona y se centrifuga de nuevo. Se repite esta operación tres veces. El sólido se lleva a sequedad en el rotavapor. Se disuelve en agua MQ y se dializa, se congela y liofiliza para obtener el producto deseado como polímero blanco. El análisis por ¹H-RMN (dms_o-d₆) confirmó su estructura (Figura 13).

55

Para la formación del gel se preparó una disolución acuosa del polímero modificado con el ciclooctino (A-octino) con una concentración de 50 mg/mL y otra disolución acuosa del polímero que porta los grupos azida (B-azida) también en una concentración de 50 mg/mL. Las dos disoluciones se mezclaron a 4°C, se calentaron a 37°C durante 10 minutos, produciéndose la reacción de *click* sin catalizador.

60

La caracterización física del hidrogel 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 superior a 500 µm.

El rango de viscoelasticidad lineal se determinó a 1 Hz de frecuencia seleccionándose dentro de este rango una deformación del 1.0%.

5 En la Tabla 8 pueden observarse los valores alcanzados del módulo elástico, módulo viscoso, la viscosidad compleja y el ángulo de desfase que indica la relación entre la elasticidad y la viscosidad compleja, para las distintas concentraciones ensayadas.

10 **Tabla 8.** Datos reológicos y de humectabilidad de hidrogeles obtenidos sin catalizador. Ensayos de inyectabilidad de las disoluciones precursoras de los hidrogeles.

Concentración (mg/ml)	G' (kPa)	G'' (kPa)	Ángulo de desfase	Viscosidad compleja η^* (kPa.s)	Grado de hinchamiento (37°C)	Inyectabilidad G20
50	2.5	0.3	6.1	0.4	3.5	Muy Fácil
100	6.7	1.1	9.2	1.1	2.4	Muy Fácil
150	8.3	1.1	7.5	1.3	2.0	Fácil
200	11.5	0.7	3.3	1.8	1.7	Fácil

EJEMPLO 4. MOLDEADO DE LOS HIDROGELES *IN VITRO* Y CON SUPERFICIES MICROESTRUCTURADAS

15 Los hidrogeles inyectables anteriormente descritos se moldearon, pudiéndose obtener láminas del espesor y tamaño deseado como potenciales substratos bioactivos para cultivos celulares *in vitro* y posterior uso como láminas implantables y portadoras de células adheridas (Figura 14).

20 Dichas láminas pueden presentar una superficie lisa o microestructurada. Se han obtenido también mediante la técnica de "replica moulding", con un patrón predefinido según las necesidades y con el fin de utilizar el substrato para el confinamiento y guiado celular durante los cultivos tanto *in vitro* como *in vivo*. Se realizaron los patrones deseados en silicio. Después se hizo con PMDS un molde con el negativo y por último se rellenó el molde con los biopolímeros para su entrecruzamiento. De esta forma se replicó el máster de silicio y se obtuvieron pilares y canales con diferentes dimensiones y forma (Fig, 25).

25 Finalmente, se dispensa la disolución de ambos polímeros modificados sobre un molde de PDMS y, una vez entrecruzados sobre su superficie, se extraen los geles del molde.

30 Se han utilizado diferentes motivos, evidenciándose a través de *microscopía óptica* y *microscopía electrónica a bajo vacío*, la replicación fiel de los mismos, obteniendo diferentes estructuras como canales o pilares de forma cuadrada o hexagonal.

Esta técnica nos permite acceder a hidrogeles microestructurados de polímero tipo elastina que sirven de soporte para cultivos celulares, ya que simulan la estructura y el comportamiento de la matriz extracelular.

35 EJEMPLO 5. BIOCAMPATIBILIZACIÓN Y BIOACTIVACIÓN DE IMPLANTES MEDIANTE RECUBRIMIENTO POR HIDROGELES A PARTIR DE BIOPOLÍMEROS ELRS.

40 Se ha conseguido recubrir implantes con un espesor suficiente, con el fin de aunar propiedades como la rigidez del implante por ejemplo metálico, con la bioactividad de los ELRS, de manera que su integración con los tejidos circundantes estará más asegurado por la capacidad de reclutamiento de los biopolímeros de células de manera específica, y porque las reacciones adversas originadas por el implante rígido son minimizadas sensiblemente.

El recubrimiento se realizó mediante la inmersión del implante en la mezcla de reacción y con un molde exterior de la forma adecuada.

45 EJEMPLO 6. LIBERACIÓN CONTROLADA DE FÁRMACOS

50 Se han realizado ensayos de liberación controlada de fármacos con hidrogeles obtenidos mediante la tecnología de la invención. Los biopolímeros utilizados fueron biopolímero A-alquino y el biopolímero B-azida y se prepararon hidrogeles para tres concentraciones totales de los biopolímeros de 50, 100 y 150 mg/ml. En la disolución con los biopolímeros se introdujo el fármaco a ensayar en una concentración de 6mg/ml (FITC insulina, fosfato de dexametasona) y 3 mg/ml (doxorubicina), se llevó a cabo la reacción y los hidrogeles obtenidos se introdujeron en un volumen de 3ml de PBS a 37°C y con agitación. Se tomaron muestras periódicamente de 1ml de volumen que se rellenaba con el mismo volumen de PBS, por tanto las medidas fueron acumulativas.

55 6.1 Curvas de liberación de Insulina para distintas concentraciones del Inyectable.

La cantidad de insulina liberada se midió mediante fluorescencia, excitando a 494 nm, y midiendo la emisión a 518 nm. Los resultados se representan en la figura 15.

La velocidad de liberación del fármaco varía con la concentración del inyectable. Para concentraciones mayores (letra C, figura 15) la liberación es más lenta y sostenida, produciéndose liberación del fármaco hasta los 60 días.

5 El análisis por SEM de bajo vacío de hidrogeles hidratados 3 días a 37°C y criofracturados, de concentraciones de 50, 100 y 150 mg/ml muestra cómo el grado de porosidad de los mismos es muy distinto, siendo previsible que altas concentraciones poliméricas dificulten la difusión del fármaco (Figura 16) por ser estos los más compactos.

6.2 Curvas de liberación de Dexametasona para distintas concentraciones del inyectable.

10

La cantidad de dexametasona liberada se determinó midiendo la absorbancia a 238 nm los resultados se representan en la figura 17.

15

La velocidad de liberación del fármaco varía con la concentración del inyectable. Para concentraciones mayores (letra C, figura 17) la liberación es más lenta y sostenida produciéndose liberación hasta unos 4 días.

Se espera que otras formulaciones del inyectable conduzcan a liberaciones más lentas.

20

EJEMPLO 7. ENSAYOS *IN VITRO* DE CÉLULAS EMBEBIDAS EN LOS ELRS PRECURSORES DE HIDROGELES VÍA “CLICK CHEMISTRY” Y EN CONSECUENCIA EN LOS HIDROGELES GENERADOS.

Se han realizado diferentes estudios de citotoxicidad, viabilidad, morfología y proliferación de diferentes tipos celulares cultivados en los hidrogeles de la presente invención:

25

- Durante el proceso de entrecruzamiento.
- Con fibroblastos, células progenitoras mesenquimales y células endoteliales.
- Para diferentes concentraciones de las disoluciones poliméricas.
- Sobre el efecto de las diferentes bioactividades introducidas en los biopolímeros que constituyen los hidrogeles.
- Sobre la idoneidad de la matriz tridimensional polimérica para mantener cultivos celulares a largo plazo.

30

El proceso de entrecruzamiento “in situ” permite crear casi instantáneamente una matriz sustitutiva de un tejido biológico. La matriz generada puede incluir células de un determinado linaje que hayan sido anteriormente expandidas *in vitro* y mezcladas con los dos componentes del sistema previamente disueltos en el medio de cultivo celular. Se depositan 100µL de dicha suspensión celular en placas de cultivos en pocillos de 2 cm² de área, también se han utilizados placas de 96 pocillos de superficie 0.3 cm² en los cuales se siembran desde 40- hasta 150 µL de suspensión (Figura 18). Los hidrogeles adquieren la forma del pocillo con menisco negativo, el material a temperatura de trabajo adquiere aspecto traslucido, en la parte central del pocillo se reduce el espesor y se consigue mejor visibilidad al microscopio, mientras en la parte más gruesa es posible identificar la disposición en diferentes planos de las células incorporadas.

35

40

7. 1 Viabilidad de células embebidas en las disoluciones precursoras de los hidrogeles

Se ha analizado el efecto de la reacción de entrecruzamiento sobre la viabilidad del cultivo celular embebido. Las líneas celulares utilizadas fueron de fibroblastos primarios humanos (HFF1) ATCC, (USA) y células endoteliales primarias humanas de vena umbilical (HUVEC) ambas de Gibco Invitrogen. Tal efecto se ha analizado mediante ensayo de viabilidad/citotoxicidad LIVE/DEAD® Assay Kit (Molecular probes) a tiempo 4 y 24 horas. Este ensayo está basado en la tinción simultánea de células vivas (en verde) y muertas (en rojo) mediante dos colorantes fluorescentes: la calceína AM y el homodímero de etidio (EthD-1), respectivamente. Los ensayos se han realizado para muestras con cobre y sin cobre. Tras el levantamiento de las células mediante débil tratamiento enzimático y mecánico, éstas se sembraron mezcladas con los polímeros A-alquino & B-azida, A-octino & B-azida (10⁴células/cm²), se incubaron durante 4 y 24 horas a 37°C en atmosfera controlada y se estudió su viabilidad mediante visualización al microscopio de las células fluorescentes (Figura 19). Se identifican como células las estructuras fluorescentes de diámetro igual o superior a 9 µm para minimizar el conteo de artefactos como falsos positivos. Se observó cómo las células tras la siembra presentan una viabilidad cercana al 90 y 100% respectivamente. La tinción realizada en este estudio ha permitido la visualización parcial de la población celular, debido al alto back-ground generado por adsorción inespecífica. Estos problemas dificultan especialmente la aplicación de la técnica para cultivos a largo plazo en los cuales la mayoría de las células han adquirido una morfología expandida. Las células redondas son de fácil observación mientras que las extendidas se confunden con el entramado del hidrogel como se ha podido estimar tras las sucesivas tinciones.

45

50

55

60

7.2 Cultivos con diferentes líneas celulares

Para constatar la viabilidad de distintas líneas celulares embebidas en los hidrogeles *click* se realizaron ensayos con fibroblastos primarios humanos (HFF1) ATCC, (USA); células humanas progenitoras mesenquimales de tejido adiposo (MSC); y células endoteliales primarias humanas de vena umbilical (HUVEC) ambas de Gibco Invitrogen. Las

condiciones de siembra han sido las anteriormente descritas, mientras que la concentración de siembra utilizada en todos los experimentos fue de 2×10^5 por mL. Tras 10 minutos desde la deposición y solidificación de la suspensión a temperatura ambiente se añade un volumen adecuado de medio de cultivo completo y se incuba siguiendo las condiciones estándar de cultivo.

5

Las concentraciones de los hidrogeles ensayados fueron de 50 mg/mL para las combinaciones: A-alquino & A-azida, A-alquino & B-azida, A-alquino & C-azida, mientras que de 100 mg/mL para los obtenidos mediante las mezclas A-octino & B-azida, A-octino & C-azida.

10

Las muestras que contenían la secuencia de adhesión universal RGD (B-azida) se han utilizado para la siembra de las HFF1 y MSC; las que contenían la secuencia específica REDV (SEQ ID NO: 6) (C-azida) para células HUVEC mientras que la mezcla (A-alquino & A-azida) se utilizó como control.

15

El análisis morfológico de las células embebidas en la estructura tridimensional se realizó por microscopía óptica tras la fijación de los hidrogeles y la tinción específica de la actina F del citoesqueleto (verde: Alexa Fluor 488 phalloidin; rojo Rhodamine phalloidin) y del núcleo (azul: 4'-6-diamino-2-phenylindole DAPI).

20

Aunque la textura, la consistencia y el espesor del gel dificultan también en estas tinciones la visualización de las células integradas, es posible analizar diferentes planos focales. En ambos tipos de mezclas (con cobre tinción en verde y azul, sin cobre en rojo y azul) se observa cómo las células embebidas interaccionan de forma específica con los diferentes sustratos y presentan la morfología típica de su tipo celular correspondiente: las HFF1 y MSC son células grandes extendidas, alargadas y fibrosas, pudiendo presentar largos procesos citoplasmáticos, mientras que la HUVEC presentan morfología poliédrica y su tamaño varía entre 30-50 μm (Fig. 20). Ha quedado demostrado con estos experimentos que las secuencias bioactivas influyen sobre el desarrollo del cultivo tridimensional. Las células endoteliales han mostrado estar presente en mayor número en las matrices que contenían la secuencia REDV que en las matrices que contenían la secuencia RGD respecto al control, de la misma manera que HFF1 y MSC en las mezclas con RGD, sea en las células cultivadas en presencias o ausencia de cobre.

25

7.3 Viabilidad y proliferación celular en relación con la concentración, la bioactividad.

30

Los estudios de viabilidad, el seguimiento de su desarrollo y la proliferación celular en hidrogeles obtenidos a partir de distintas concentraciones poliméricas se evalúan tanto mediante observación tras fijación y tinción como por la medida de la actividad metabólica del cultivo (reducción fluorimétrica del reactivo Alamar Blue) a diferentes intervalos de tiempos y durante un periodo de hasta 60 días.

35

Los estudios de la viabilidad en relación a la concentración de la matriz polimérica se realizan cultivando fibroblastos en hidrogeles de concentración entre 12.5 y 150 mg/mL.

40

Los resultados indican que concentraciones iguales o mayores de 75 mg/mL (75, 100, 150 mg/mL) no son citotóxicas, para los tiempos ensayados, ya que el número de células activas se mantiene durante el tiempo del experimento, aunque determinan un escaso crecimiento del cultivo (Figura 21 A). El crecimiento de los fibroblastos mejora si se introducen en hidrogeles de menor concentración (12.5, 25 y 50 mg/mL) Figura 21 B. De eso se deduce que aunque este tipo celular sea viable en geles más compactos en los cuales se evidencian células bien extendidas tras una semana de cultivo (Fig. 21 C), los fibroblastos en los tiempos examinados se expanden mejor en matrices de una menor consistencia.

45

El hecho de que tales hidrogeles sean viables en un amplio rango de concentraciones y de propiedades mecánicas permite poder elegir la concentración polimérica más apropiada a la aplicación, y así reproducir la variedad de consistencia y dureza que presentan los tejidos biológicos.

50

Por otra parte, también se observó que las diferencias de la composición del material influye específicamente sobre la adhesión y el desarrollo del cultivo (fibroblastos cultivados en hidrogeles A-alquino & B-azida o endoteliales cultivados en A-alquino & B-azida A-alquino & C-azida). Materiales que contuviesen secuencias bioactivas mostraron un número de células activas estimadas sustancialmente mayor respecto al material control (Figura 22).

55

Los estudios a largo plazo de la viabilidad/proliferación y morfológicos se realizan cultivando MSC en hidrogeles A-alquino & B-azida de concentración de 50mg/mL y realizando periódicamente mediciones de número de células metabólicamente activas y análisis del fenotipo celular. Se eligió esta concentración debido a que en los experimentos previos presentaba la mejor manejabilidad y un buen crecimiento celular. En ambos estudios se verifica cómo los cultivos presentan un crecimiento sigmoidal, con una fase lenta durante los primeros veinte días, una fase de crecimiento logarítmico entre los 20 y 40 que van estabilizándose en la siguiente fase. Respecto al crecimiento sobre el sustrato convencional in vitro, se observa un retraso en primera fase que luego se compensa en la fase rápida de crecimiento y determina una mayor estabilidad metabólica en la etapa estacionaria de cultivo (Figura 23).

60

5 En la figura 24 se muestran microfotografías de cultivos a diferentes tiempos de incubación. Tras 24 horas se evidencia cómo las células están en la mayoría vivas y han adquirido la típica morfología celular. Tras 15 días de cultivo la concentración de las células se vuelve más homogénea en todo el hidrogel, serie de tomas a lo largo de 50 micras de espesor nos muestran cómo en todas las secciones (Z plain) hay células de las mismas características morfológicas. Tras 35 días de cultivo las células proliferan y ocupan gran parte del hidrogel, la colonización del hidrogel es completa tras los 60 días, indicando que estos hidrogeles son “scaffolds” capaces de sostener el cultivo a largo plazo de este tipo de células.

REIVINDICACIONES

- 5 1. Un hidrogel que comprende un biopolímero A y un biopolímero B de tipo elastina entrecruzados directamente entre sí de manera covalente, donde cada uno de dichos biopolímeros comprende:
- a) al menos 3 repeticiones del péptido SEQ ID NO: 1 (YPY'XY''), donde:
X se selecciona de ente L-lisina, L-serina, L-tirosina, L-treonina, L-cisteina, Ácido Aspártico, Ácido Glutámico, L-arginina, L-asparagina y L-Glutamina,
Y' es glicina o L-Alanina,
10 Y y Y'' son iguales o diferentes y son cualquier aminoácido natural, excepto L-prolina, y son distintos a X, y
- b) al menos una repetición del péptido con SEQ ID NO: 2 (YPY'Y''Y'''),
15 donde dichos biopolímeros A y B pueden ser iguales o diferentes.
2. El hidrogel según la reivindicación 1 donde X es L-lisina.
3. El hidrogel según cualquiera de las reivindicaciones 1 ó 2, donde los biopolímeros además comprenden al menos uno de los péptidos SEQ ID NO: 3 a SEQ ID NO: 5.
- 20 4. El hidrogel según la reivindicación 3, donde los péptidos SEQ ID NO: 3 a SEQ ID NO: 5 están repetidos entre 2 y 250 veces.
- 25 5. El hidrogel según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, donde al menos uno de los biopolímeros comprende un péptido que se selecciona de la lista que comprende: RGD, LDT, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 8 o SEQ ID NO: 9, un dominio de unión a heparina o un dominio de unión a azúcares derivado de lectina y aglutinina.
- 30 6. El hidrogel según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, que además comprende células.
7. El hidrogel según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, que además comprende un principio activo.
8. Método para la obtención del hidrogel según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7 que comprende las siguientes etapas:
- 35 a) sustitución, en el biopolímero A, del grupo reactivo del aminoácido X en al menos tres de las repeticiones de la SEQ ID NO: 1 por un grupo seleccionado de entre: grupos alquenoilo, grupos alquino, grupos nitrilo, grupos carbonilo o grupos imina;
- b) sustitución, en el biopolímero B, del grupo reactivo del aminoácido X en al menos tres de las repeticiones de la SEQ ID NO: 1 por grupos azida; y
- 40 c) entrecruzamiento de los biopolímeros obtenidos en las etapas (a) y (b) mediante "click chemistry".
9. El método según la reivindicación 8, donde la sustitución del paso (a) se lleva a cabo con grupos alquenoilo.
- 45 10. El método según cualquiera de las reivindicaciones 8 ó 9, donde la sustitución del paso (b) se lleva a cabo mediante sustitución con azida triflica generada "in situ".
11. El método según cualquiera de las reivindicaciones 9 ó 10, donde el aminoácido X de la SEQ ID NO: 1 del biopolímero A es L-lisina, L-asparagina, L-Glutamina o L-arginina y donde la sustitución del paso (a) con grupos alquenoilo se lleva a cabo mediante amidación catalizada por dicitohexilcarbodiimida, entre el grupo amino del aminoácido X de la SEQ ID NO: 1 del biopolímero A y un anhídrido de un ácido, haluro de ácido o un alcohol que porta un grupo alquino.
- 50 12. El método según la reivindicación 11, donde el anhídrido de ácido, haluro de ácido o el alcohol se seleccionan de entre: anhídrido pentanoico, haluro de propargilo o alcohol propargílico.
- 55 13. El método según cualquiera de las reivindicaciones 9 ó 10, donde el aminoácido X de la SEQ ID NO: 1 del biopolímero A es L-treonina, L-serina, L-cisteina, L-tirosina, Ácido Glutámico o Ácido Aspártico y donde la sustitución del paso (a) con grupos alquenoilo se lleva a cabo mediante esterificación.
- 60 14. El método según cualquiera de las reivindicaciones 8 a 13, donde la etapa (c) se lleva a cabo mediante inyección de los dos biopolímeros resultantes de las etapas (a) y (b) en forma de disolución acuosa.
15. El método según la reivindicación 14, donde la disolución acuosa tiene un pH de entre 5 y 11.
- 65 16. El método según cualquiera de las reivindicaciones 8 a 15, donde la etapa (c) se lleva a cabo en ausencia de Cu(I).

17. Un implante que comprende el hidrogel según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7.
18. Uso del hidrogel según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7 para la elaboración o recubrimiento de un implante.
- 5 19. Uso del hidrogel según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, para la elaboración de un medicamento.
20. Uso del hidrogel según la reivindicación 19 para la elaboración de un medicamento para la administración controlada de un principio activo.
- 10 21. Uso del hidrogel según la reivindicación 19, para la elaboración de un medicamento para la administración de células.
22. Uso según cualquiera de las reivindicaciones 20 ó 21 para la elaboración de un medicamento para la administración combinada de células y un principio activo.

FIG. 1

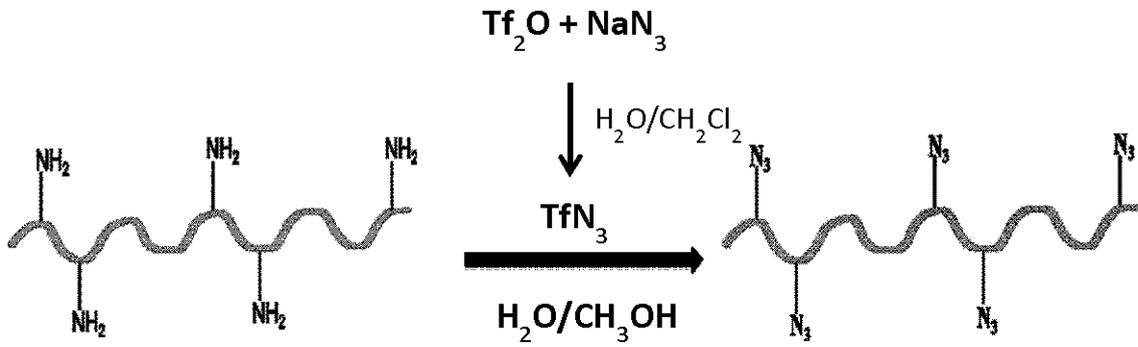


FIG. 2

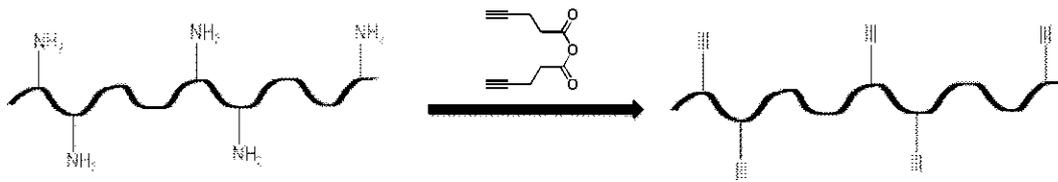


FIG. 3

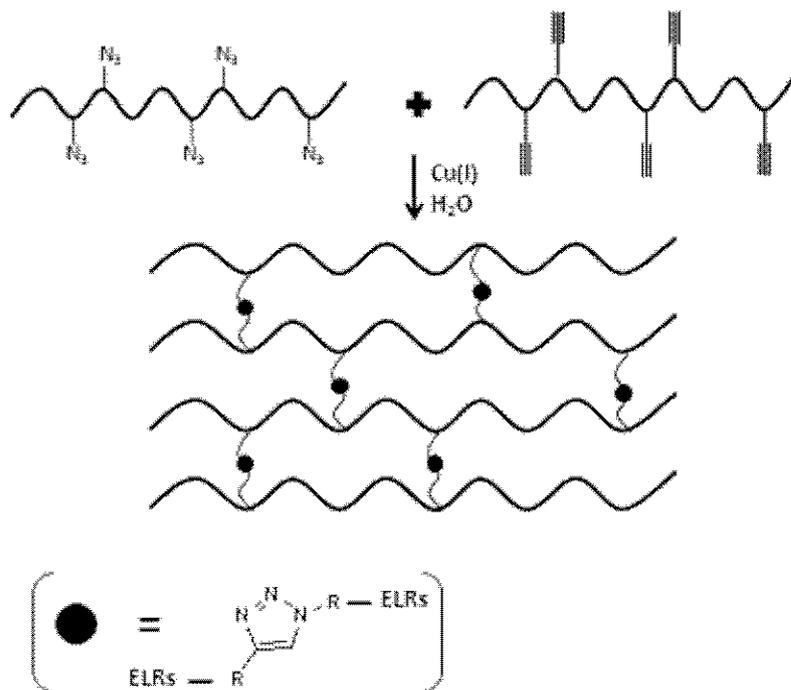


FIG. 4

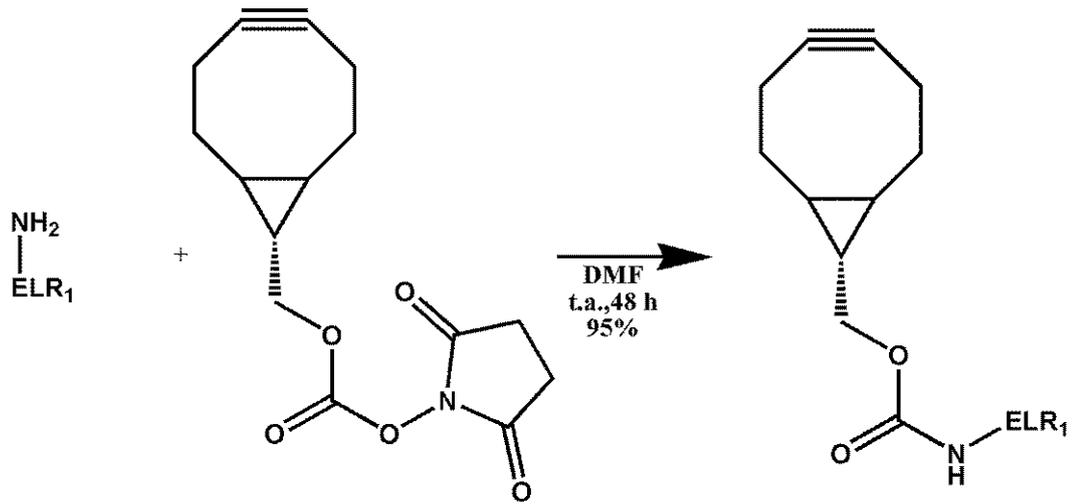


FIG. 5

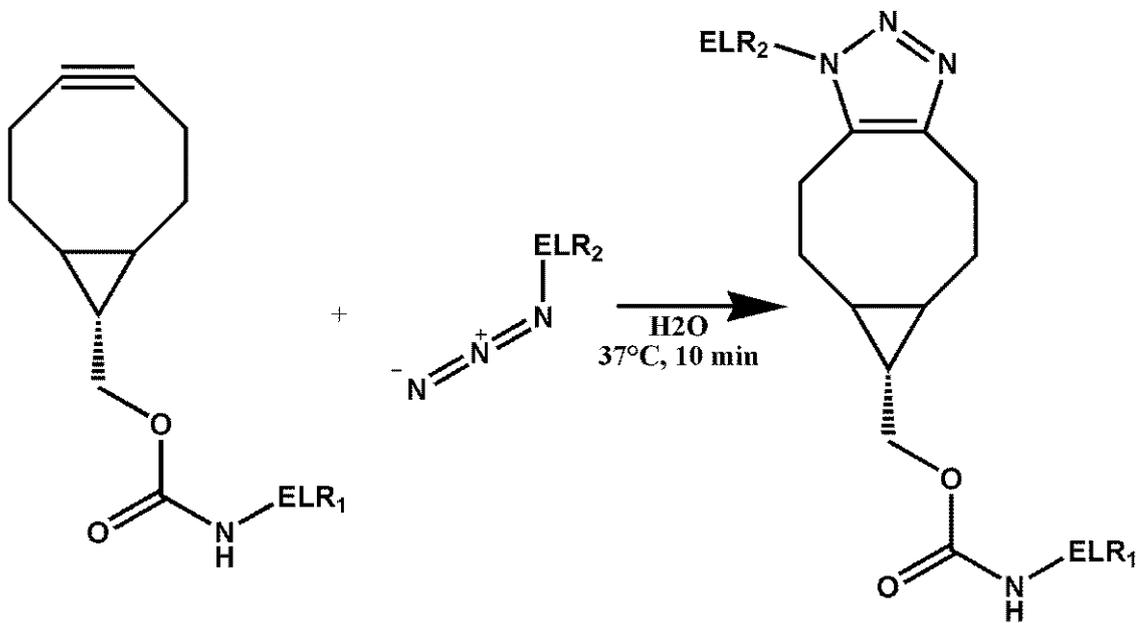
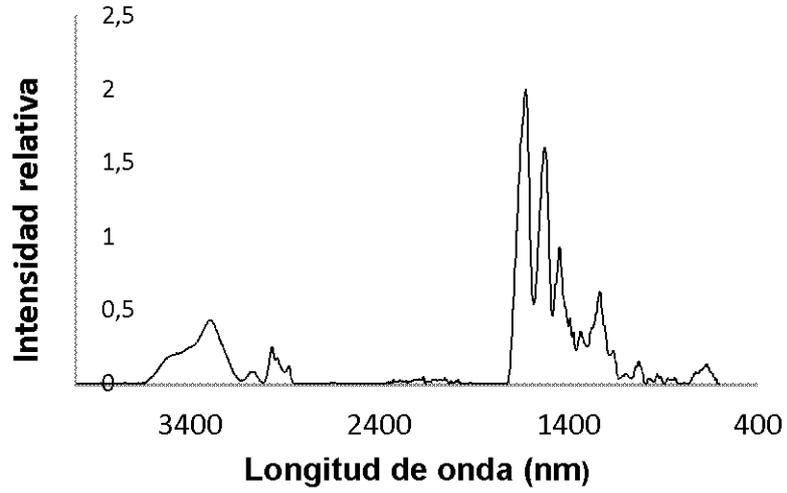
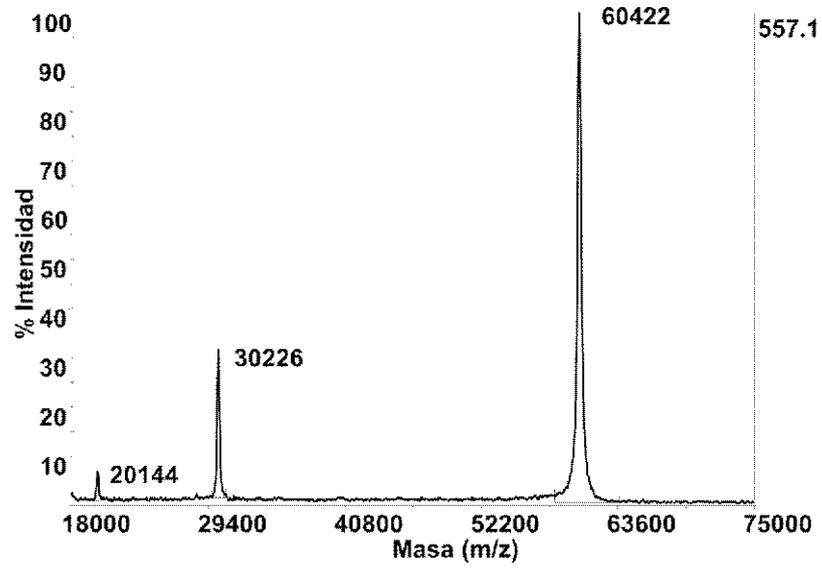


FIG. 6

A



B



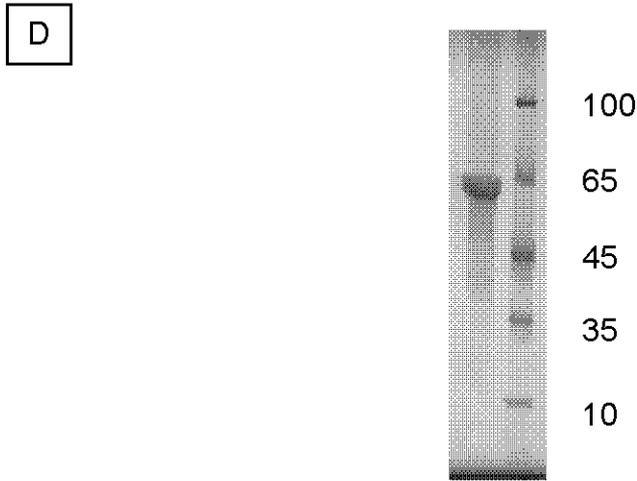
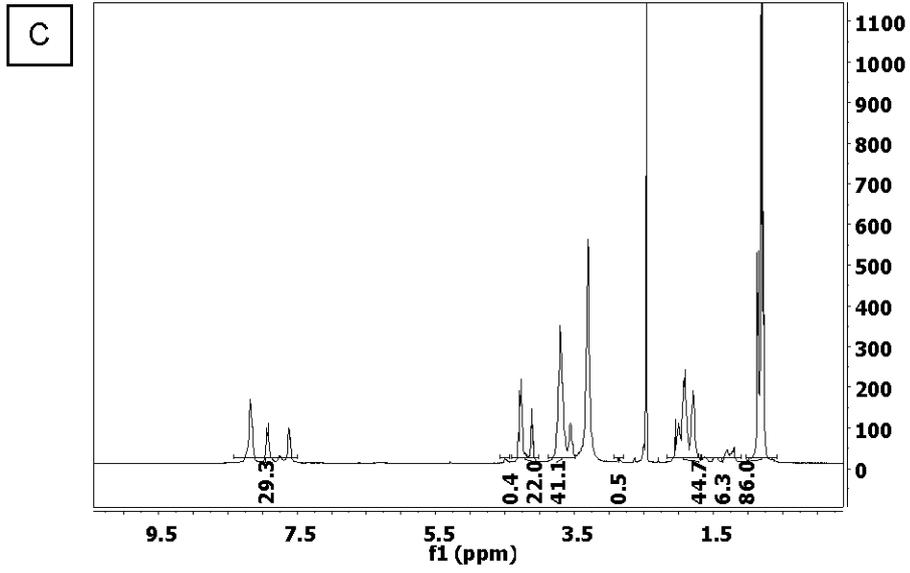
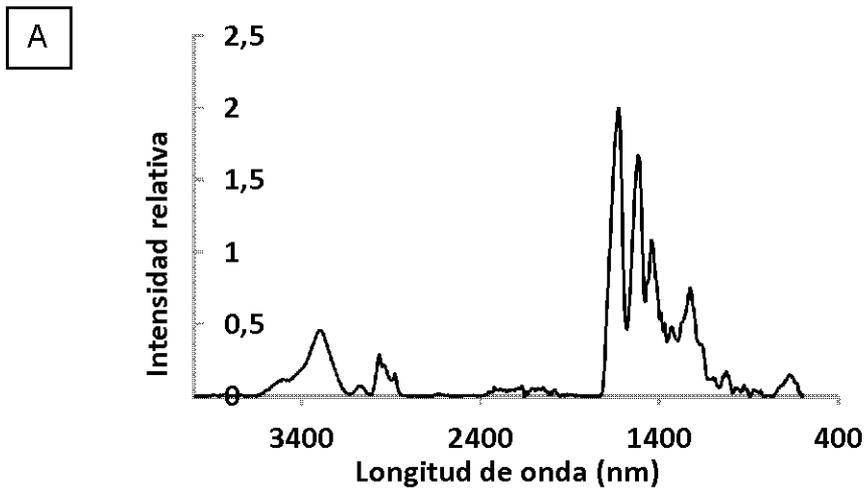
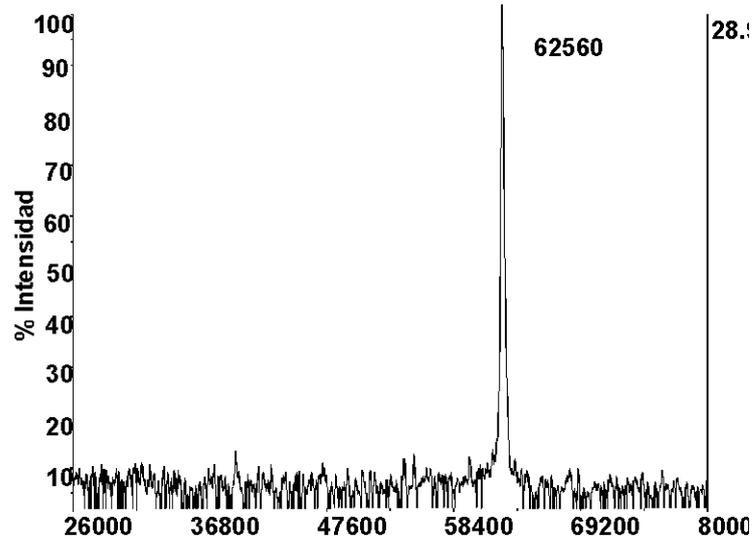


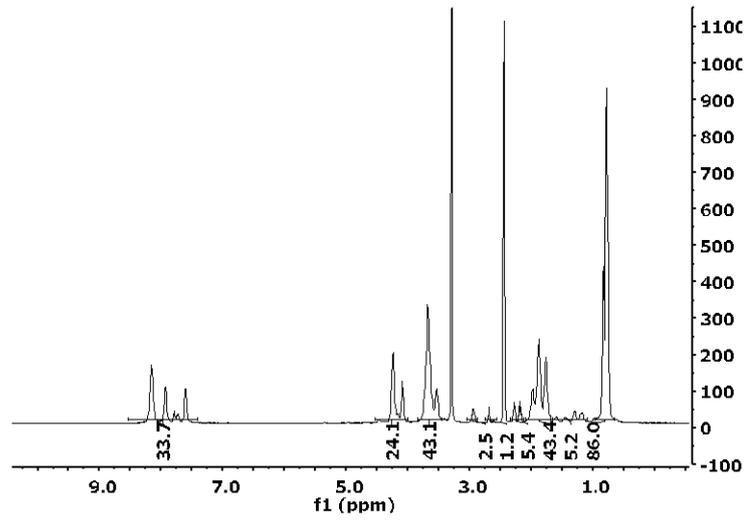
FIG. 7



B



C



D

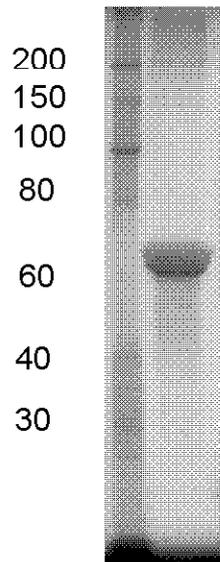
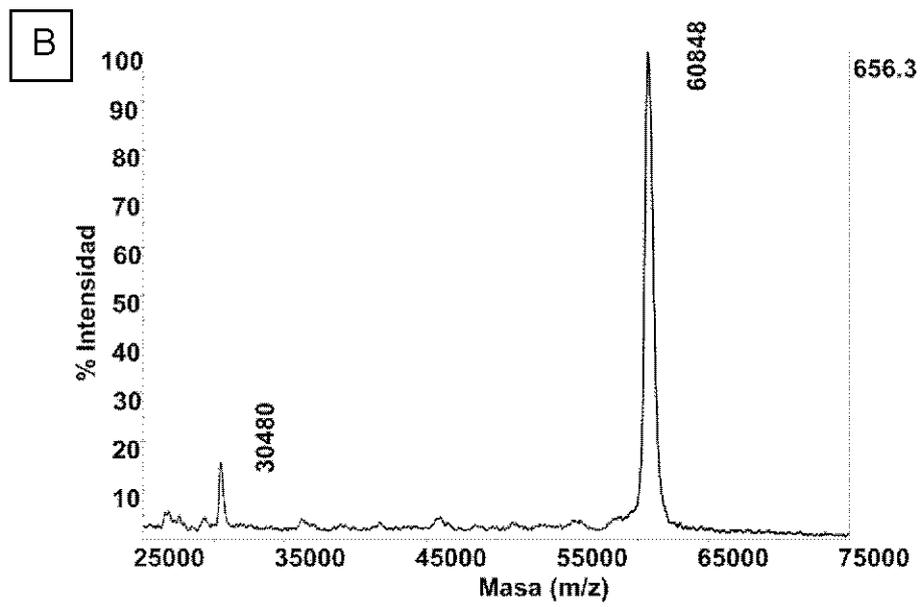
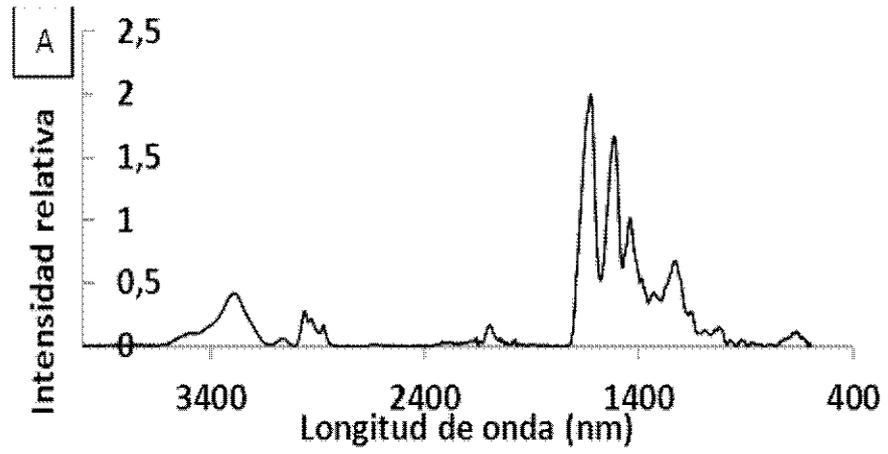


FIG. 8



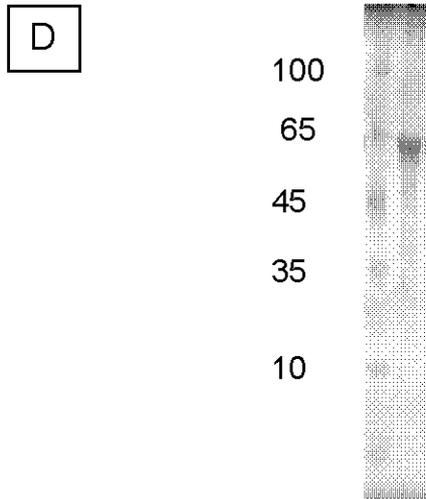
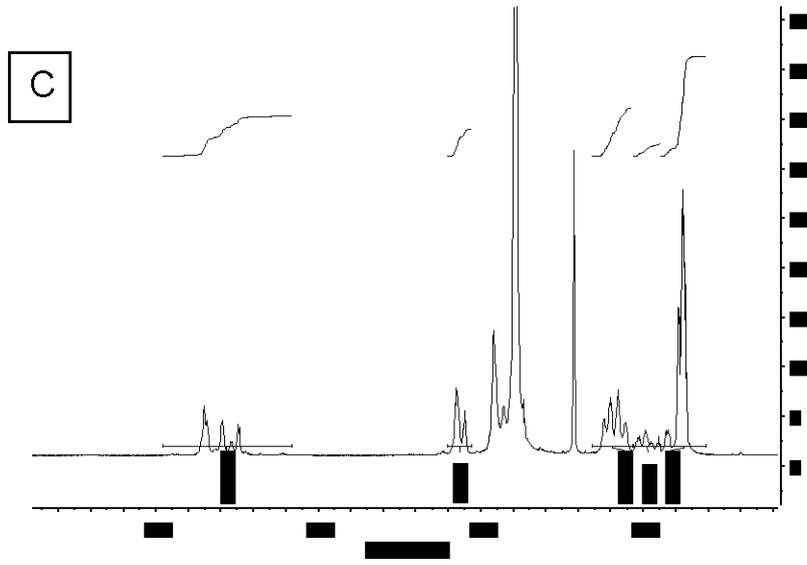


FIG. 9

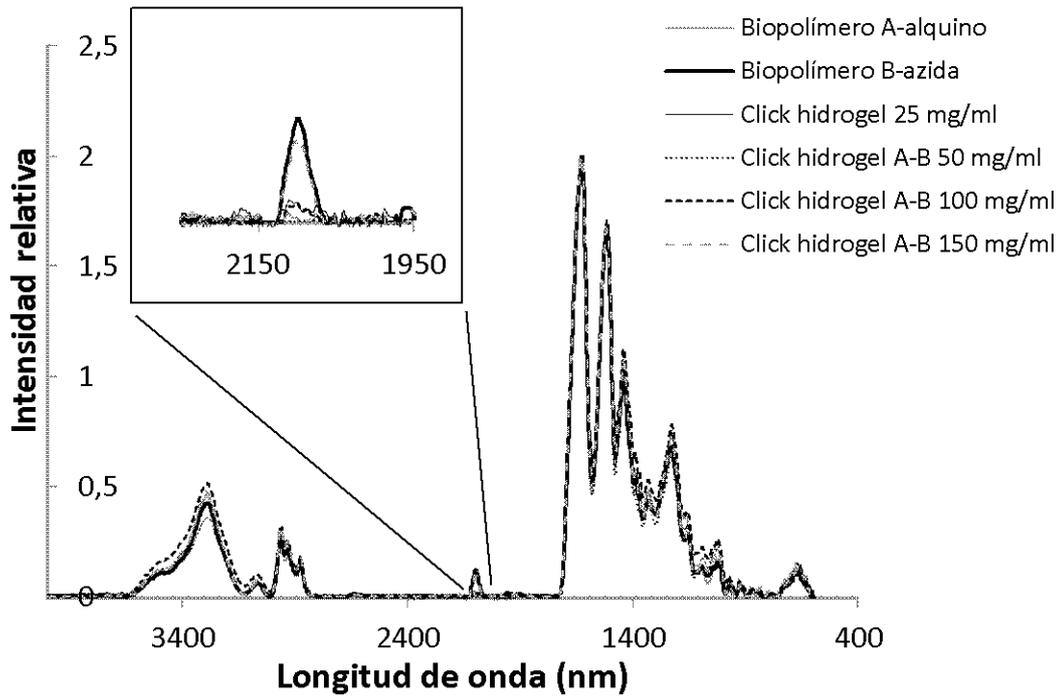


FIG. 10

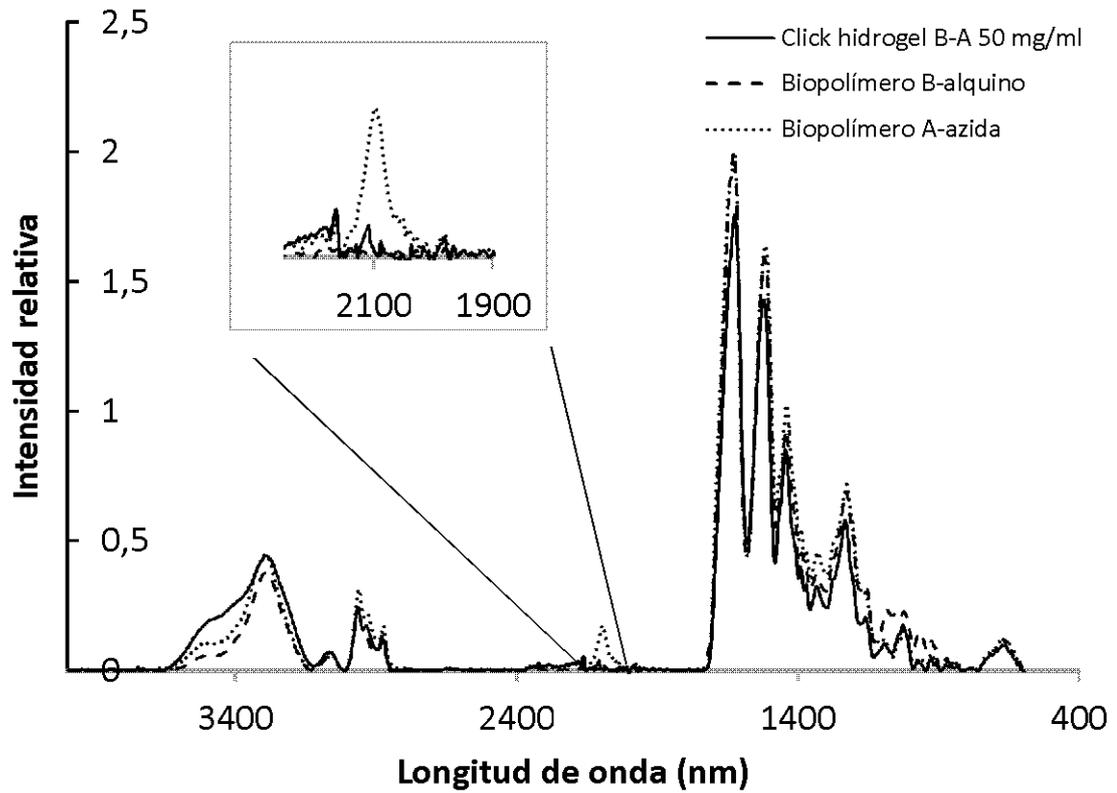


FIG. 11

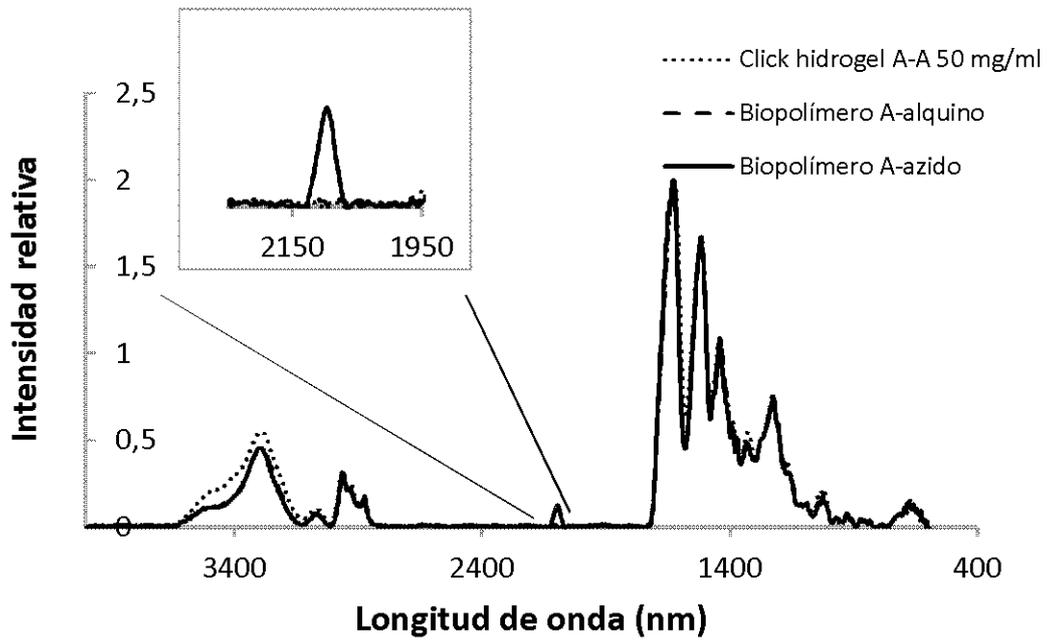


FIG. 12

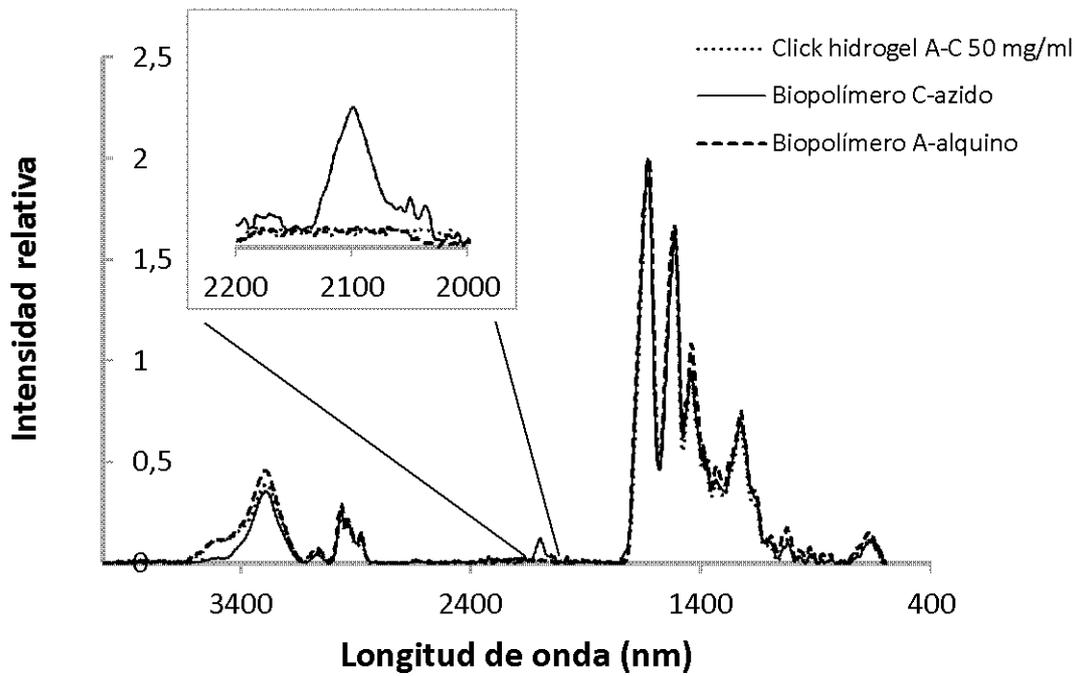


FIG. 13

B-octino

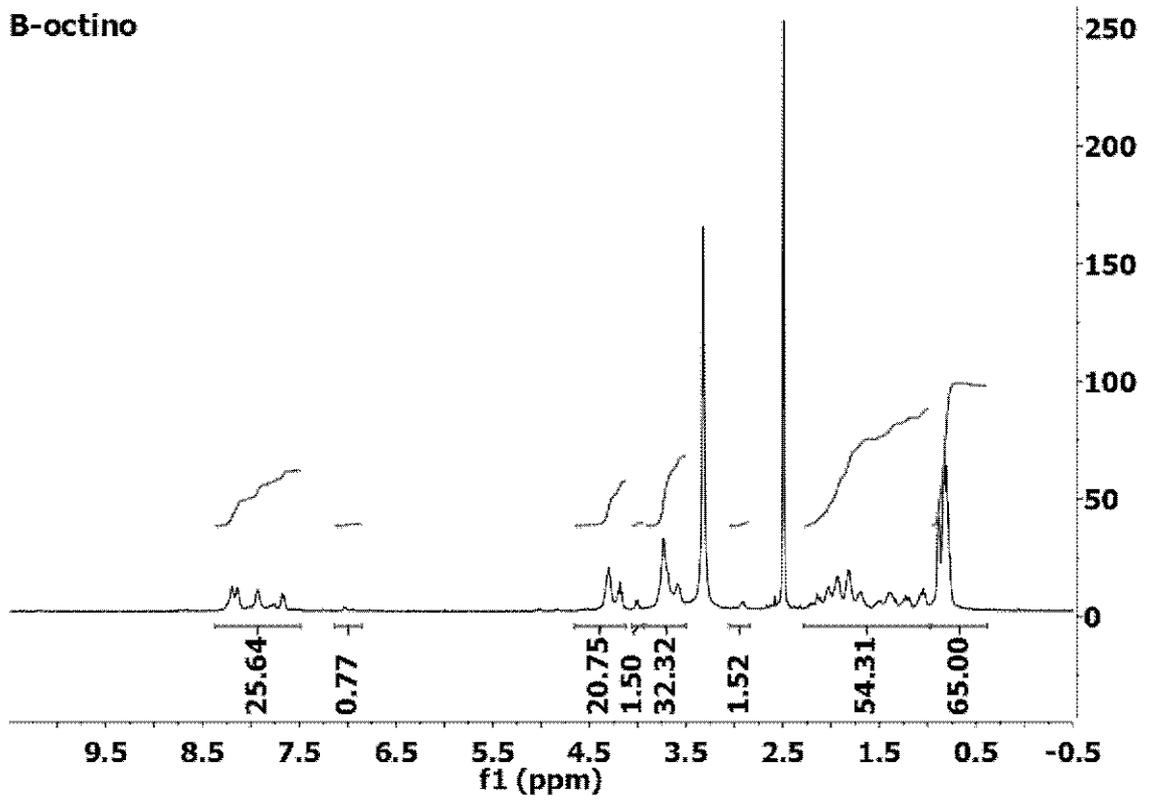


FIG. 14

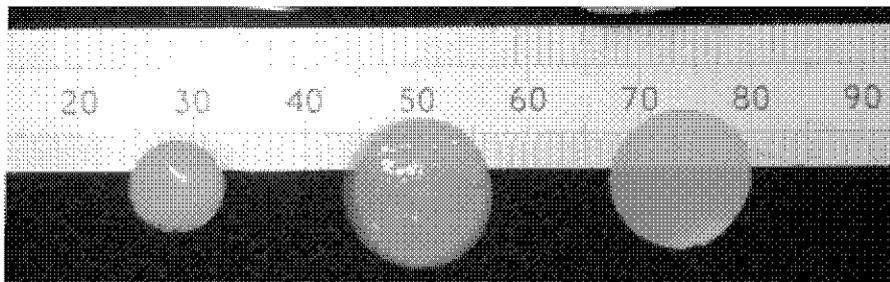


FIG. 15

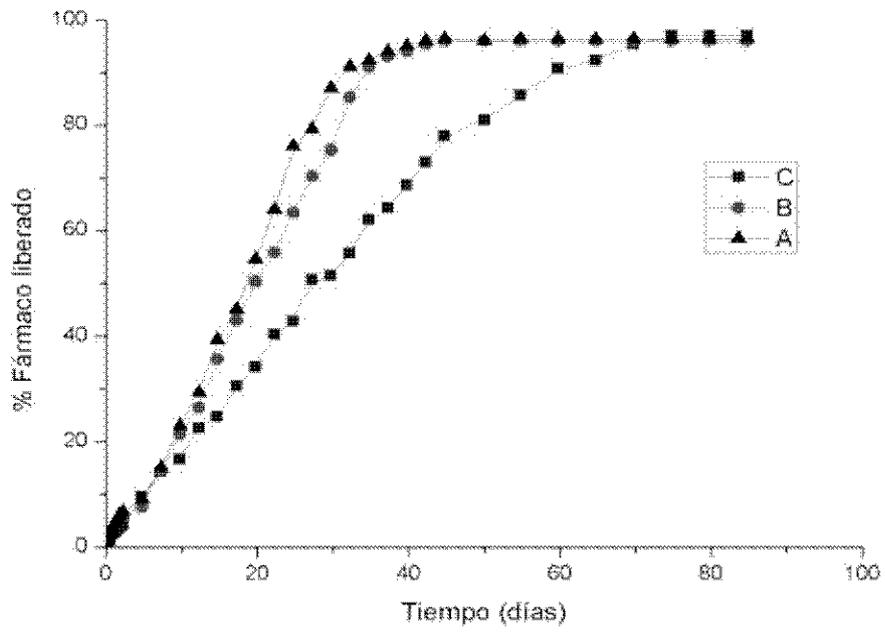


FIG. 16

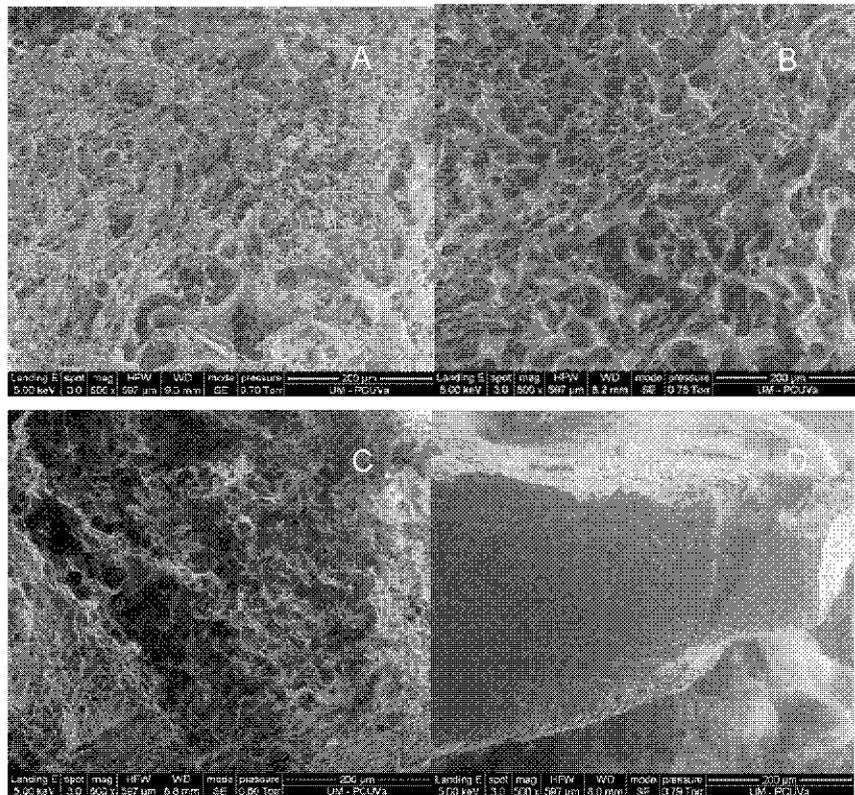


FIG. 17

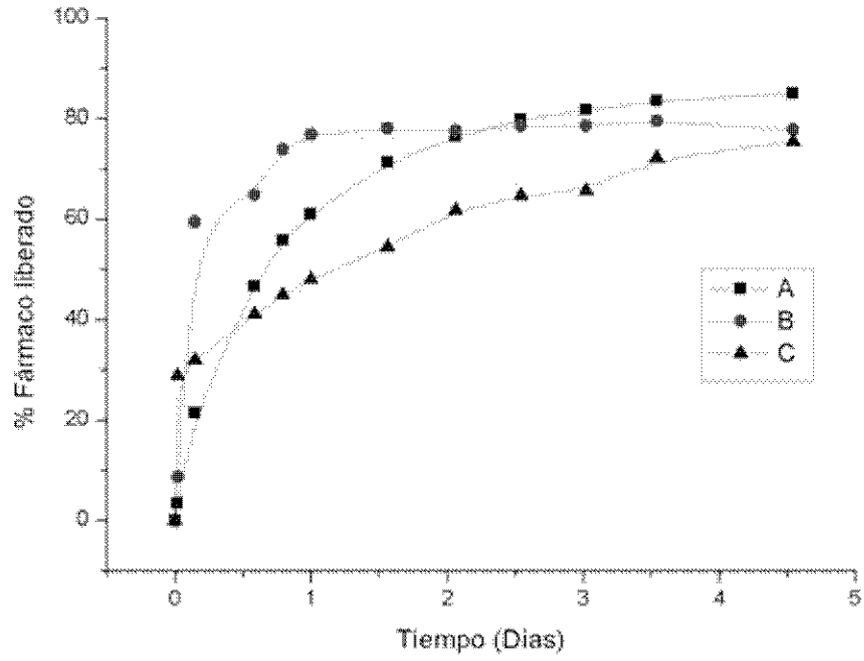


FIG. 18



FIG. 19

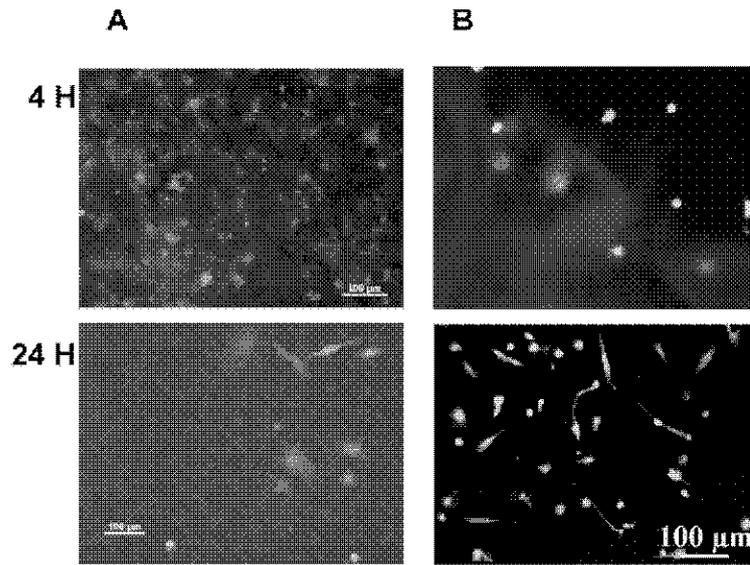


FIG. 20

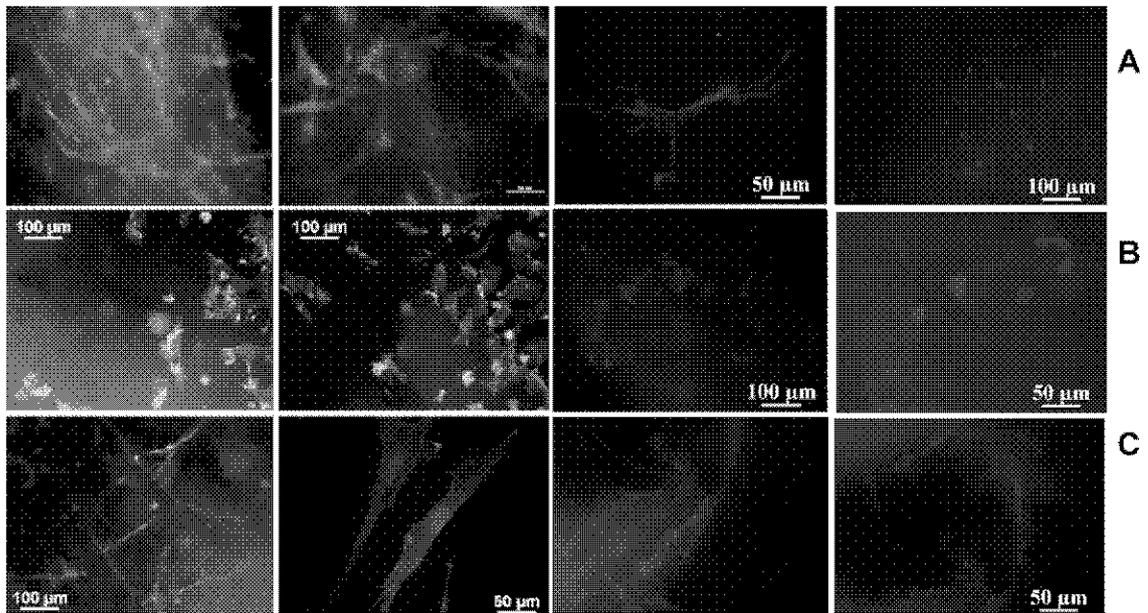


FIG. 21

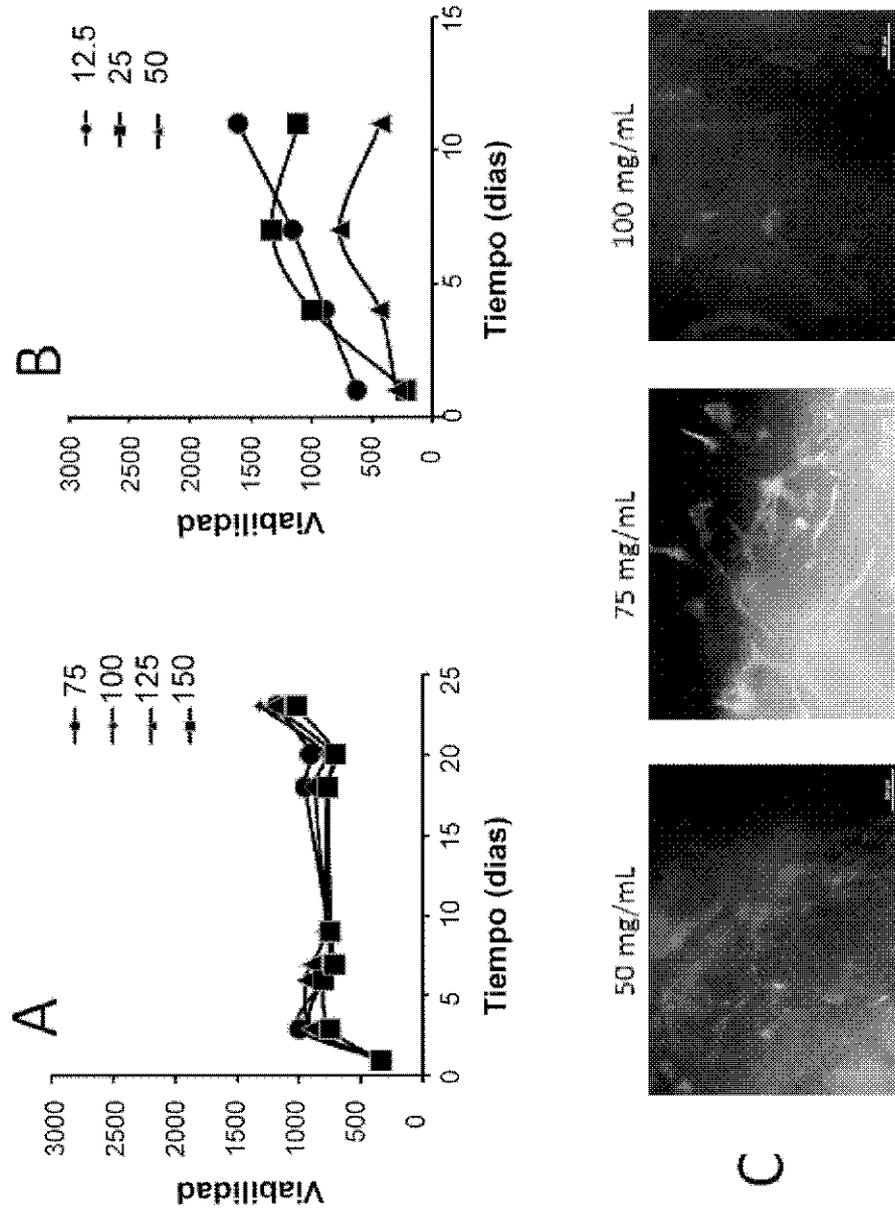


FIG. 22

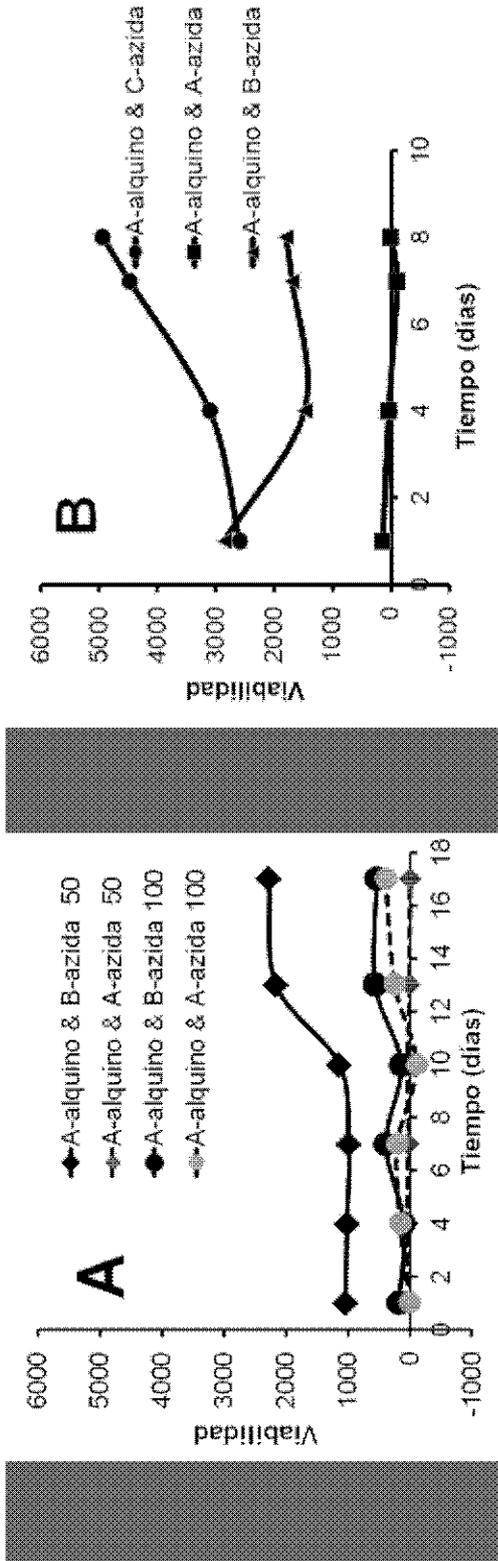


FIG. 23

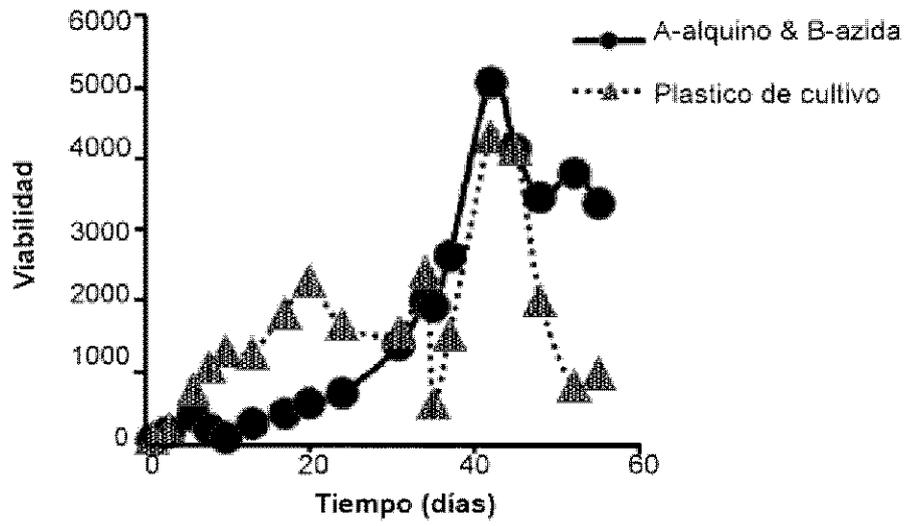


FIG. 24

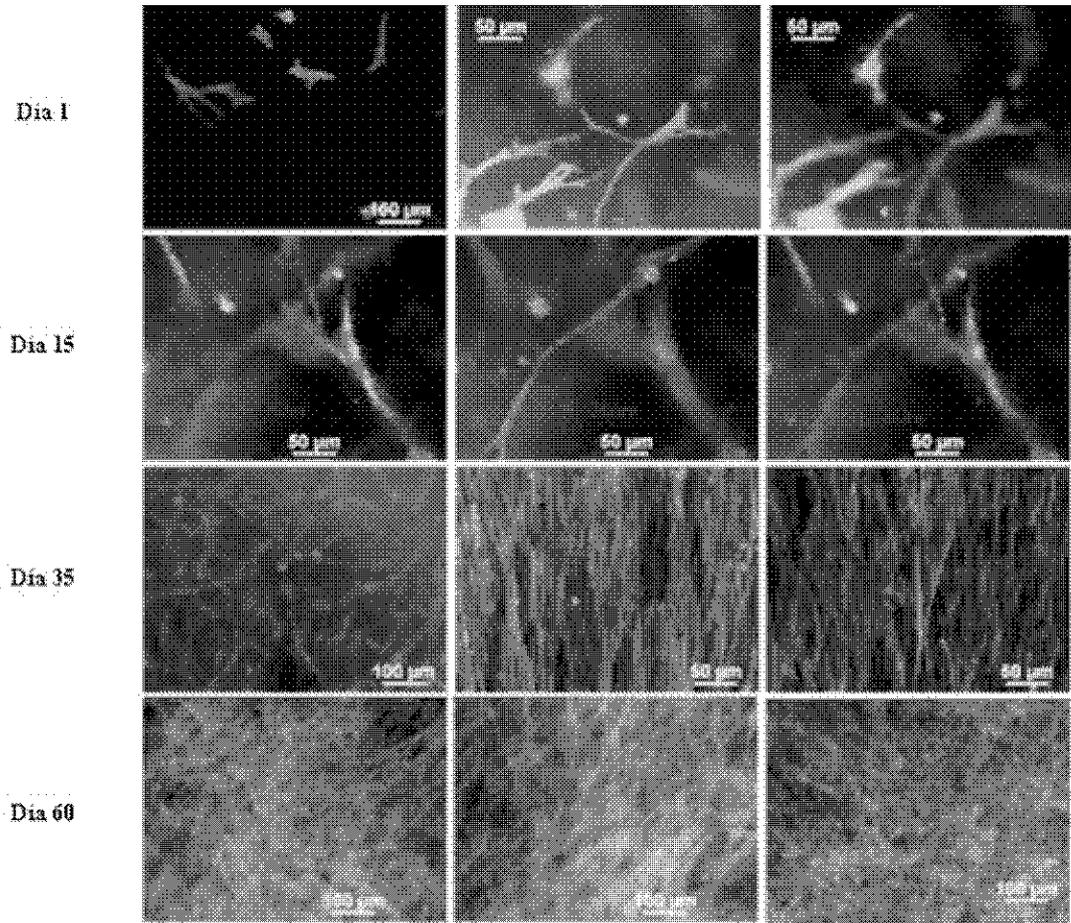
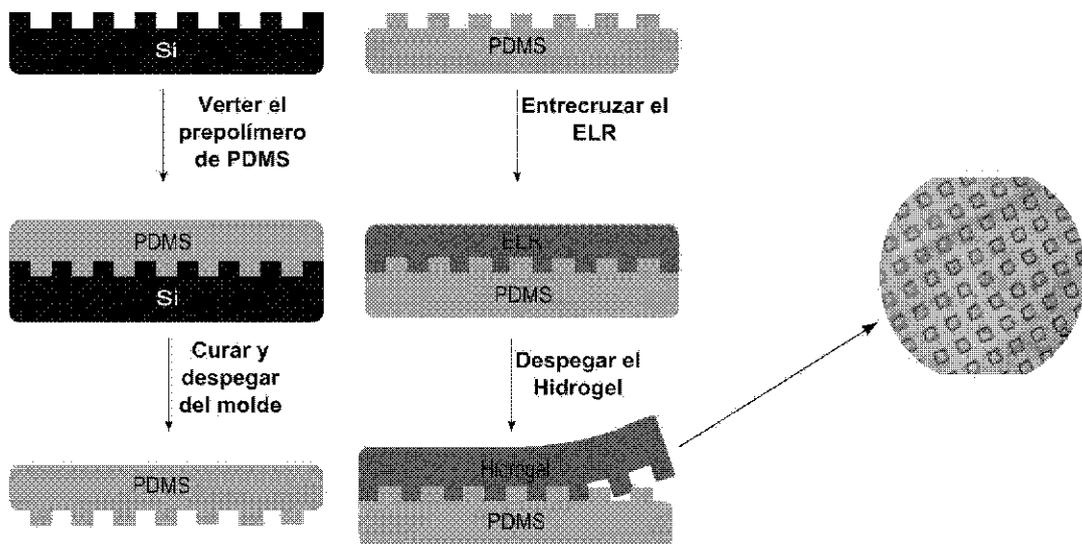


FIG. 25



ES 2 455 441 A1

LISTADO DE SECUENCIAS

<110> Universidad de Valladolid

<120> HIDROGEL ÚTIL COMO SOPORTE INYECTABLE PARA APLICACIÓN EN TERAPIA CELULAR Y COMO SISTEMA DE LIBERACIÓN CONTROLADA DE FÁRMACOS

<130> ES2080.9

<160> 16

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1
<211> 5
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Péptido comprendido en el biopolímero A y el biopolímero B

<220>
<221> VARIANT
<222> (1)..(1)
<223> /note = "cualquier aminoácido natural, excepto L-Pro, y es distinto al aminoácido en posición 4"

<220>
<221> VARIANT
<222> (3)..(3)
<223> /replace = "Gly"

/replace = "L-Ala"

<220>
<221> VARIANT
<222> (4)..(4)
<223> /replace = "L-Lys" or "L-Ser" or "L-Tyr" or "L-Thr" or "L-Cys" or "Asp" or "Glu" or "L-Arg" or "L-Asn" or "L-Gln"

<220>
<221> VARIANT
<222> (5)..(5)
<223> /note = "cualquier aminoácido natural, excepto L-Pro, y es distinto al aminoácido en posición 4"

<400> 1

Xaa Pro Xaa Xaa Xaa
1 5

<210> 2
<211> 5
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Péptido comprendido en el biopolímero A y el biopolímero B.

<220>
<221> VARIANT
<222> (1)..(1)
<223> /note = "cualquier aminoácido natural excepto L-Pro y es distinto al aminoácido en la posición 4 de la SEQ ID NO: 1"

<220>

ES 2 455 441 A1

<221> VARIANT
<222> (3)..(3)
<223> /replace = "Gly" or "L-Ala"

<220>
<221> VARIANT
<222> (4)..(4)
<223> /note = "cualquier aminoácido natural excepto L-Pro y es distinto al aminoácido en la posición 4 de la SEQ ID NO: 1"

<220>
<221> VARIANT
<222> (5)..(5)
<223> /note = "cualquier aminoácido natural excepto L-Pro y es distinto al aminoácido en la posición 4 de la SEQ ID NO: 1"

<400> 2

Xaa Pro Xaa Xaa Xaa
1 5

<210> 3
<211> 6
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Péptido comprendido dentro del biopolímero A y el biopolímero B

<400> 3

Val Gly Val Ala Pro Gly
1 5

<210> 4
<211> 12
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Péptido comprendido dentro del biopolímero A y el biopolímero B

<400> 4

Ala Val Thr Gly Arg Gly Asp Ser Pro Ala Ser Ser
1 5 10

<210> 5
<211> 19
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Péptido comprendido dentro del biopolímero A y el biopolímero B

<400> 5

Glu Glu Ile Gln Ile Gly His Ile Pro Arg Glu Asp Val Asp Tyr His
1 5 10 15

Leu Tyr Pro

<210> 6

ES 2 455 441 A1

<211> 4
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 6

Arg Glu Asp Val
1

<210> 7
<211> 4
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 7

Asp Gly Glu Ala
1

<210> 8
<211> 5
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 8

Tyr Ile Gly Ser Arg
1 5

<210> 9
<211> 9
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 9

Gln Ala Ala Ser Ile Lys Val Ala Val
1 5

<210> 10
<211> 37
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Biopolímero VK24

<220>
<221> REPEAT
<222> (7)..(36)
<223> Repetido 24 veces

<400> 10

Met Glu Ser Leu Leu Pro Val Gly Val Pro Gly Val Gly Val Pro Gly
1 5 10 15

Lys Gly Val Pro Gly Val Gly Val Pro Gly Val Gly Val Pro Gly Val
20 25 30

Gly Val Pro Gly Val
35

ES 2 455 441 A1

<210> 11
 <211> 69
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

<220>
 <223> Biopolímero RGD6

<220>
 <221> REPEAT
 <222> (27)..(31)
 <223> Repetido 2 veces

<220>
 <221> REPEAT
 <222> (27)..(41)
 <223> Repetido 2 veces

<220>
 <221> REPEAT
 <222> (27)..(68)
 <223> Repetido 6 veces

<220>
 <221> REPEAT
 <222> (37)..(41)
 <223> Repetido 2 veces

<220>
 <221> REPEAT
 <222> (54)..(58)
 <223> Repetido 2 veces

<220>
 <221> REPEAT
 <222> (54)..(68)
 <223> Repetido 2 veces

<220>
 <221> REPEAT
 <222> (64)..(68)
 <223> Repetido 2 veces

<400> 11

Met Gly Ser Ser His His His His His His Ser Ser Gly Leu Val Pro
 1 5 10 15

Arg Gly Ser His Met Glu Ser Leu Leu Pro Val Pro Gly Ile Gly Val
 20 25 30

Pro Gly Lys Gly Val Pro Gly Ile Gly Ala Val Thr Gly Arg Gly Asp
 35 40 45

Ser Pro Ala Ser Ser Val Pro Gly Ile Gly Val Pro Gly Lys Gly Val
 50 55 60

Pro Gly Ile Gly Val
 65

<210> 12

ES 2 455 441 A1

<211> 62
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

<220>
 <223> Biopolímero REDVx10

<220>
 <221> REPEAT
 <222> (7)..(11)
 <223> Repetido 2 veces

<220>
 <221> REPEAT
 <222> (7)..(61)
 <223> Repetido 10 veces

<220>
 <221> REPEAT
 <222> (17)..(21)
 <223> Repetido 2 veces

<220>
 <221> REPEAT
 <222> (41)..(45)
 <223> Repetido 2 veces

<220>
 <221> REPEAT
 <222> (51)..(55)
 <223> Repetido 2 veces

<220>
 <221> REPEAT
 <222> (56)..(61)
 <223> Repetido 3 veces

<400> 12

Met Glu Ser Leu Leu Pro Val Pro Gly Ile Gly Val Pro Gly Lys Gly
 1 5 10 15

Val Pro Gly Ile Gly Glu Glu Ile Gln Ile Gly His Ile Pro Arg Glu
 20 25 30

Asp Val Asp Tyr His Leu Tyr Pro Val Pro Gly Ile Gly Val Pro Gly
 35 40 45

Lys Gly Val Pro Gly Ile Gly Val Gly Val Ala Pro Gly Val
 50 55 60

<210> 13
 <211> 55
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

<220>
 <223> Biopolímero PIT2

<220>
 <221> REPEAT
 <222> (7)..(11)
 <223> Repetido 2 veces

ES 2 455 441 A1

<220>
 <221> REPEAT
 <222> (7)..(55)
 <223> Repetido 10 veces

<220>
 <221> REPEAT
 <222> (17)..(21)
 <223> Repetido 2 veces

<220>
 <221> REPEAT
 <222> (41)..(45)
 <223> Repetido 2 veces

<220>
 <221> REPEAT
 <222> (51)..(55)
 <223> Repetido 2 veces

<400> 13

Met Glu Ser Leu Leu Pro Val Pro Gly Ile Gly Val Pro Gly Lys Gly
 1 5 10 15

Val Pro Gly Ile Gly Glu Glu Ile Gln Ile Gly His Ile Pro Arg Glu
 20 25 30

Asp Val Asp Tyr His Leu Tyr Pro Val Pro Gly Ile Gly Val Pro Gly
 35 40 45

Lys Gly Val Pro Gly Ile Gly
 50 55

<210> 14
 <211> 2184
 <212> DNA
 <213> Secuencia Artificial

<220>
 <223> Secuencia de nucleotidos que codifica la secuencia de aminoácidos
 SEQ ID NO: 10

<400> 14
 atggaatccc tgctgccggt aggtgttccg ggcgttggtg tgccgggcaa aggtgttccg 60
 ggcgtgggtg ttccgggtgt gggcgttcca ggtgttggtg tgcctggtgt tggcgtaccg 120
 ggtgttggtg ttccgggtaa aggcgtgcct ggtgttggtg tgccgggtgt tgggttccg 180
 ggcgtgggtg ttccaggcgt ggggttccg ggcgttggtg tgccgggcaa ggggttccg 240
 ggcgtgggtg ttccgggtgt gggcgttcca ggtgttggtg tgcctggtgt tggcgtaccg 300
 ggtgttggtg ttccgggtaa aggcgttccg ggtgtgggtg ttccgggtgt tgggtgtgccg 360
 ggcgttggtg ttccaggcgt aggtgttccg ggcgttggtg tgccgggcaa aggtgttccg 420
 ggcgtgggtg ttccgggtgt gggcgttcca ggtgttggtg tgcctggtgt tggcgtaccg 480
 ggtgttggtg ttccgggtaa aggcgtgcct ggtgttggtg tgccgggtgt tgggttccg 540
 ggcgtgggtg ttccaggcgt ggggttccg ggcgttggtg tgccgggcaa ggggttccg 600

ES 2 455 441 A1

ggcgtgggtg ttccgggtgt gggcgttcca ggtgttggcg tgcctggtgt tggcgtaccg 660
 ggtgttggcg ttccgggtaa aggcgttcct ggtgtgggcg ttccgggtgt tgggtgtgccg 720
 ggcgttgggtg ttccaggcgt aggtgttccg ggcgttgggtg tgccgggcaa aggtgttccg 780
 ggcgtgggtg ttccgggtgt gggcgttcca ggtgttggcg tgcctggtgt tggcgtaccg 840
 ggtgttggcg ttccgggtaa aggcgtgcct ggtgttggcg tgccgggtgt tgggtgttccg 900
 ggcgtgggtg ttccaggcgt ggggtgttccg ggcgttgggtg tgccgggcaa ggggtgttccg 960
 ggcgtgggtg ttccgggtgt gggcgttcca ggtgttggcg tgcctggtgt tggcgtaccg 1020
 ggtgttggcg ttccgggtaa aggcgttcct ggtgtgggcg ttccgggtgt tgggtgtgccg 1080
 ggcgttgggtg ttccaggcgt aggtgttccg ggcgttgggtg tgccgggcaa aggtgttccg 1140
 ggcgtgggtg ttccgggtgt gggcgttcca ggtgttggcg tgcctggtgt tggcgtaccg 1200
 ggtgttggcg ttccgggtaa aggcgtgcct ggtgttggcg tgccgggtgt tgggtgttccg 1260
 ggcgtgggtg ttccaggcgt ggggtgttccg ggcgttgggtg tgccgggcaa ggggtgttccg 1320
 ggcgtgggtg ttccgggtgt gggcgttcca ggtgttggcg tgcctggtgt tggcgtaccg 1380
 ggtgttggcg ttccgggtaa aggcgttcct ggtgtgggcg ttccgggtgt tgggtgtgccg 1440
 ggcgttgggtg ttccaggcgt aggtgttccg ggcgttgggtg tgccgggcaa aggtgttccg 1500
 ggcgtgggtg ttccgggtgt gggcgttcca ggtgttggcg tgcctggtgt tggcgtaccg 1560
 ggtgttggcg ttccgggtaa aggcgtgcct ggtgttggcg tgccgggtgt tgggtgttccg 1620
 ggcgtgggtg ttccaggcgt ggggtgttccg ggcgttgggtg tgccgggcaa ggggtgttccg 1680
 ggcgtgggtg ttccgggtgt gggcgttcca ggtgttggcg tgcctggtgt tggcgtaccg 1740
 ggtgttggcg ttccgggtaa aggcgttcct ggtgtgggcg ttccgggtgt tgggtgtgccg 1800
 ggcgttgggtg ttccaggcgt aggtgttccg ggcgttgggtg tgccgggcaa aggtgttccg 1860
 ggcgtgggtg ttccgggtgt gggcgttcca ggtgttggcg tgcctggtgt tggcgtaccg 1920
 ggtgttggcg ttccgggtaa aggcgtgcct ggtgttggcg tgccgggtgt tgggtgttccg 1980
 ggcgtgggtg ttccaggcgt ggggtgttccg ggcgttgggtg tgccgggcaa ggggtgttccg 2040
 ggcgtgggtg ttccgggtgt gggcgttcca ggtgttggcg tgcctggtgt tggcgtaccg 2100
 ggtgttggcg ttccgggtaa aggcgttcct ggtgtgggcg ttccgggtgt tgggtgtgccg 2160
 ggcgttgggtg ttccaggcgt atga 2184

<210> 15
 <211> 2100
 <212> DNA
 <213> Secuencia Artificial

<220>
 <223> Secuencia de nucleótidos que codifica la secuencia de aminoácidos
 SEQ ID NO: 11

<400> 15
 atgggcagca gccatcatca tcatcatcac agcagcggcc tgggtgccgcg cggcagccat 60
 atggaatccc tgctgccggt accgggcatc ggtgttccgg gcattggtgt gccgggcaaa 120

ES 2 455 441 A1

ggtgttccgg gcattggtgt gccgggcatc ggtgtgccag gcattggtgt gccgggcatc 180
 ggtgttccgg gcaaggggtgt gccgggcatt ggtgtgccag gcatcgggtgc agtaaccggt 240
 cgtggggatt ctctgcgctc cagcgtcccg ggcacgggtg ttccgggcat tgggtgtgccg 300
 ggcaaagggtg ttccgggcat tgggtgtgccg ggcacgggtg tgccaggcat tgggtgtgccg 360
 ggcatcgggtg ttccgggcaa aggtgtgcca ggcacgggtg tgccgggcat tgggtgtaccg 420
 ggcatcgggtg ttccgggcat tgggtgtgccg ggcaaagggtg ttccgggcat tgggtgtgccg 480
 ggcatcgggtg tgccaggcat tgggtgtgccg ggcacgggtg ttccgggcaa ggggtgtgccg 540
 ggcatcgggtg tgccaggcat cgggtgcagta accggtcgtg gggattctcc tgcgtccagc 600
 gtcccgggca tcggtgttcc gggcattggt gtgccgggca aaggtgttcc gggcattggt 660
 gtgccgggca tcggtgtgcc aggcattggt gtgccgggca tcggtgttcc gggcaaagggt 720
 gtgccaggca tcggtgtgcc gggcattggt gtaccgggca tcggtgttcc gggcattggt 780
 gtgccgggca aaggtgttcc gggcattggt gtgccgggca tcggtgtgcc aggcattggt 840
 gtgccgggca tcggtgttcc gggcaaagggt gtgccgggca ttgggtgtgcc aggcacgggt 900
 gcagtaaccg gtcgtgggga ttctctgctc tccagcgtcc cgggcatcgg tgttccgggc 960
 attggtgtgc cgggcaaagg tgttccgggc attggtgtgc cgggcatcgg tgtgccaggc 1020
 attggtgtgc cgggcatcgg tgttccgggc aaaggtgtgc caggcatcgg tgtgccgggc 1080
 attggtgtac cgggcatcgg tgttccgggc attggtgtgc cgggcaaagg tgttccgggc 1140
 attggtgtgc cgggcatcgg tgtgccaggc attggtgtgc cgggcatcgg tgttccgggc 1200
 aaggggtgtgc cgggcattgg tgtgccaggc atcgggtgag taaccgggtc tggggattct 1260
 cctgcgtcca gcgtcccggg catcgggtgtt ccgggcattg gtgtgccggg caaaggtgtt 1320
 ccgggcattg gtgtgccggg catcgggtgtg ccaggcattg gtgtgccggg catcgggtgtt 1380
 ccgggcaaag gtgtgccagg catcgggtgtg ccgggcattg gtgtaccggg catcgggtgtt 1440
 ccgggcattg gtgtgccggg caaaggtgtt ccgggcattg gtgtgccggg catcgggtgtg 1500
 ccaggcattg gtgtgccggg catcgggtgtt ccgggcaagg gtgtgccggg cattggtgtg 1560
 ccaggcatcg gtgcagtaac cggtcgtggg gattctcctg cgtccagcgt cccgggcatc 1620
 ggtgttccgg gcattggtgt gccgggcaaa ggtgttccgg gcattggtgt gccgggcatc 1680
 ggtgtgccag gcattggtgt gccgggcatc ggtgttccgg gcaaaggtgt gccaggcatc 1740
 ggtgtgccgg gcattggtgt accgggcatc ggtgttccgg gcattggtgt gccgggcaaa 1800
 ggtgttccgg gcattggtgt gccgggcatc ggtgtgccag gcattggtgt gccgggcatc 1860
 ggtgttccgg gcaaggggtgt gccgggcatt ggtgtgccag gcatcgggtgc agtaaccggt 1920
 cgtggggatt ctctgcgctc cagcgtcccg ggcacgggtg ttccgggcat tgggtgtgccg 1980
 ggcaaagggtg ttccgggcat tgggtgtgccg ggcacgggtg tgccaggcat tgggtgtgccg 2040
 ggcatcgggtg ttccgggcaa aggtgtgcca ggcacgggtg tgccgggcat tgggtgtatga 2100

<210> 16
 <211> 2634

ES 2 455 441 A1

<212> DNA
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> Secuencia de nucleótido que codifica la secuencia de aminoácidos
 SEQ ID NO: 12
 <400> 16

atggaatccc tgctgccggt accgggcatc ggtgttccgg gcattggtgt gccgggcaaa	60
ggtgttccgg gcattggtgt gccgggcatt ggtgaagaaa tccagatcgg gcatatccca	120
cgcgaggatg tggactacca cctgtatccg gtgccaggca ttggtgtgcc gggcattggt	180
gttccgggca aagggtgtgcc gggcattggt gttccgggca tcggtgtggg cgttgcgccg	240
ggtgtgggcg ttgccccggg tgtgggcggt gcaccgggtg taccgggcat cgggtgttccg	300
ggcattggtg tgccgggcaa aggtgttccg ggcattggtg tgccgggcat tggatgaagaa	360
atccagatcg ggcataatccc acgcgaggat gtggactacc acctgtatcc ggtgccaggc	420
attggtgtgc cgggcattgg tgttccgggc aaagggtgtgc cgggcattgg tgttccgggc	480
atcgggtgtg gcggtgcgcc ggggtgtggc gttgccccgg gtgtgggcgt tgcaccgggt	540
gtaccgggca tcggtgttcc gggcattggt gtgccgggca aagggtgttcc gggcattggt	600
gtgccgggca ttggtgaaga aatccagatc gggcataatcc cacgcgagga tgtggactac	660
cacctgtatc cggtgccagg cattggtgtg ccgggcattg gtgttccggg caaagggtgtg	720
ccgggcattg gtgttccggg catcgggtgtg ggcgttgcgc cgggtgtggg cgttgccccg	780
ggtgtgggcg ttgaccggg tgtaccgggc atcgggtgtt cgggcattgg tgtgccgggc	840
aaagggtgtt cgggcattgg tgtgccgggc attggtgaag aatccagat cgggcataatc	900
ccacgcgagg atgtggacta ccacctgtat ccggtgccag gcattggtgt gccgggcatt	960
ggtgttccgg gcaaagggtg gccgggcatt ggtgttccgg gcatcgggtg gggcgttgcg	1020
ccgggtgtg gcggtgcccc ggggtgtggc gttgcaccgg gtgtaccggg catcgggtgtt	1080
ccgggcattg gtgtgccggg caaagggtgt ccgggcattg gtgtgccggg cattggtgaa	1140
gaaatccaga tcgggcatat ccacgcgag gatgtggact accacctgta tccggtgcca	1200
ggcattggtg tgccgggcat tgggtgttcc ggcaaagggt tgccgggcat tgggtgttccg	1260
ggcatcggtg tgggcgttgc gccgggtgtg ggcgttgcgc cgggtgtggg cgttgcaccg	1320
ggtgtaccgg gcatcgggtg tccgggcatt ggtgtgccgg gcaaagggtg tccgggcatt	1380
ggtgtgccgg gcattggtga agaaatccag atcgggcata tcccacgca ggatgtggac	1440
taccacctgt atccgggtgc aggcattggt gtgccgggca ttggtgttcc gggcaaagggt	1500
gtgccgggca ttggtgttcc gggcatcggg gtgggcggtg cgccgggtgt gggcgttgcc	1560
ccgggtgtg gcggtgcacc ggggtgtacc ggcacgggtg ttccgggcat tgggtgtgccg	1620
ggcaaagggt ttccgggcat tgggtgtgcc ggcattggtg aagaaatcca gatcgggcat	1680
atcccacgcg aggatgtgga ctaccacctg tatccgggtg caggcattgg tgtgccgggc	1740
attggtgtt cgggcaaagg tgtgccgggc attggtgtt cgggcacatcg tgtgggcggt	1800
gcgccgggtg tgggcgttgc cccgggtgtg ggcgttgcac cgggtgtacc gggcatcggg	1860

ES 2 455 441 A1

gttccgggca ttggtgtgcc gggcaaaggt gttccgggca ttggtgtgcc gggcattggt	1920
gaagaaatcc agatcgggca tatcccacgc gaggatgtgg actaccacct gtatccggtg	1980
ccaggcattg gtgtgccggg cattggtggt ccgggcaaag gtgtgccggg cattggtggt	2040
ccgggcatcg gtgtgggcgt tgcgccgggt gtgggcgttg ccccggtgt gggcgttgca	2100
ccgggtgtac cgggcatcgg tgttccgggc attggtgtgc cgggcaaagg tgttccgggc	2160
attggtgtgc cgggcattgg tgaagaaatc cagatcgggc atatcccacg cgaggatgtg	2220
gactaccacc tgtatccggt gccaggcatt ggtgtgccgg gcattggtgt tccgggcaaa	2280
ggtgtgccgg gcattggtgt tccgggcatc ggtgtgggcg ttgcgccggg tgtgggcgtt	2340
gccccgggtg tgggcgttgc accgggtgta ccgggcatcg gtgttccggg cattggtgtg	2400
ccgggcaaag gtgttccggg cattggtgtg ccgggcattg gtgaagaaat ccagatcggg	2460
catatcccac gcgaggatgt ggactaccac ctgtatccgg tgccaggcat tgggtgtgccg	2520
ggcattggtg ttccgggcaa aggtgtgccg ggcattggtg ttccgggcat cgggtgtgggc	2580
gttgcgccgg gtgtgggcgt tgccccgggt gtgggcgttg caccgggtgt atga	2634