

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 754 824**

21 Número de solicitud: 201831008

51 Int. Cl.:

C07K 14/78 (2006.01)
A61L 27/52 (2006.01)
A61L 27/36 (2006.01)
A61L 27/22 (2006.01)
C09D 11/00 (2014.01)
C12N 15/00 (2006.01)

12

SOLICITUD DE PATENTE

A1

22 Fecha de presentación:

17.10.2018

43 Fecha de publicación de la solicitud:

20.04.2020

71 Solicitantes:

UNIVERSIDAD DE VALLADOLID (100.0%)
Plaza de Santa Cruz, 5 Bajo
47002 Valladolid ES

72 Inventor/es:

SALINAS FERNÁNDEZ, Soraya;
RODRÍGUEZ CABELLO, José Carlos;
ALONSO RODRÍGO, Matilde y
SANTOS GARCÍA, Mercedes

74 Agente/Representante:

PONS ARIÑO, Ángel

Observaciones:

La lista de secuencias está accesible al público en la página web de la OEPM para su descarga en formato electrónico.

54 Título: **COMPOSICIÓN A BASE DE BIOPOLÍMEROS RECOMBINANTES Y USOS DE LA MISMA COMO BIOTINTA**

57 Resumen:

Composición a base de biopolímeros recombinantes y usos de la misma como biotinta.

La presente invención se refiere a composiciones que comprenden biopolímeros recombinantes formados por combinaciones de monómeros de tipo "Recombinámeros Tipo Elastina" (ELR, de sus siglas en inglés Elastin-Like Recombinamers), monómeros que comprenden la secuencia denominada "silk" (seda) y/o monómeros que comprenden la secuencia denominada HLF y que pertenece a una clase natural de proteínas denominadas zippers. Dichas composiciones son útiles para su uso como biotinta para impresión 3D. Además, la presente invención también se refiere a los métodos para la obtención de la composición de la invención, así como al biomaterial 3D y a los diferentes usos tanto de la composición como del biomaterial obtenido.

ES 2 754 824 A1

DESCRIPCIÓN

Composición a base de biopolímeros recombinantes y usos de la misma como biotinta

5

La presente invención se refiere a composiciones que comprenden biopolímeros recombinantes sintetizados a base de monómeros de tipo “Recombinámeros Tipo Elastina” (ELR, de sus siglas en inglés *Elastin-Like Recombinamers*), monómeros que comprenden la secuencia denominada “*silk*” (seda) procedente del gusano de seda
10 *Bombix mori* y/o monómeros que comprenden la secuencia denominada HLF y que pertenece a una clase natural de proteínas denominadas *zipper*s. Dichas composiciones son útiles para su uso como biotinta para impresión 3D. Además, la presente invención también se refiere a los métodos para la obtención de la composición de la invención, así como al biomaterial 3D y a los diferentes usos tanto
15 de la composición como del biomaterial que la comprende.

ANTECEDENTES DE LA INVENCION

Las técnicas de bioimpresión 3D incluyen estereolitografía, bioimpresión basada en
20 chorro de tinta, bioimpresión basada en láser y bioimpresión basada en extrusión, siendo ésta última la más utilizada. En la bioimpresión basada en extrusión, un hidrogel es introducido dentro de un cartucho y extruido a presión sobre una superficie. Las estructuras impresas se fabrican por deposición capa a capa del material controlando el movimiento temporal y espacial por medio de software CAM – CAD
25 (*Computer Aid Manufacturing - Computer Aid Design*).

Hasta ahora, se han realizado numerosas investigaciones utilizando la técnica de extrusión para mimetizar tejidos tales como hueso, tejido cardiaco, cartílago, hígado, pulmón, tejido nervioso, piel y tejido pancreático (Ozbolat, I.T., *et al.* Drug Discovery
30 Today, 2016. 21(8): p. 1257-1271). También se ha utilizado para realizar modelados *in vitro* sobre enfermedades y liberación de fármacos (Vanderburgh, J., *et al.* Ann Biomed Eng, 2017. 45(1): p. 164-179).

Los parámetros que debe cumplir un material para poder ser utilizado en bioimpresión
35 3D se refieren tanto a su proceso de impresión, destacando particularmente la

printabilidad, afectada por parámetros fisicoquímicos como son sus propiedades reológicas (viscosidad, pseudoplasticidad, viscoelasticidad y límite elástico) y los mecanismos de entrecruzamiento; y aquellas características que permitan su uso como material biomédico, tales como la biocompatibilidad, destacando que su cinética
5 de degradación debe coincidir con la habilidad de las células para formar su propia matriz extracelular, y sus productos de degradación no deben ser tóxicos para las mismas.

Existe una amplia variedad de materiales utilizados como biotintas, entre los que se encuentran aquellos que se han utilizado a lo largo del tiempo en ingeniería de tejidos, presentando estructura de hidrogeles. Estos hidrogeles utilizados como biotintas se dividen en naturales (por ejemplo: alginato, gelatina, agarosa, ácido hialurónico, quitosano, matriz extracelular descelularizada, péptidos de DNA, y proteínas estructurales como el colágeno, fibroina de seda y fibrina) y sintéticos (por ejemplo:
15 poli(ácido láctico co-glicólico (PLGA), ácido plurónico, polietilenglicol (PEG), poli(ácido L-láctico) (PLA) y poli (ϵ -caprolactona) (PCL)). Pese a la variedad de biotintas existentes, basadas en biopolímeros naturales, sintéticos e incluso en mezclas de ambos, todavía existen muchos inconvenientes que limitan su uso, sobre todo con respecto a las propiedades mecánicas y estructurales de las matrices impresas, al
20 mostrar en determinados casos una alta hidrofiliidad, lo que limita su uso con células, alta viscosidad que dificulta su impresión, baja integridad de forma, rápida gelificación y entrecruzamiento, etc. Otro de los inconvenientes no superados aún, radica también en la ausencia de biocompatibilidad o de dominios bioactivos que permiten su interacción celular.

25 Para solventar las desventajas que presentan las biotintas formadas a base de polímeros, mencionadas anteriormente, se han seguido varias estrategias: (1) Métodos de gelificación que establezcan las estructuras, basados principalmente en procesos físicos (interacciones iónicas, puentes de hidrógeno o interacciones hidrofóbicas), químicos (enlaces covalentes generados por medio de reacciones
30 químicas) o una combinación de ambos (Jungst, T., *et al.* Chemical Reviews. 2016 116(3): 1496-1539); (2) utilización de tintas multicomponentes o híbridas, que intentan suplir normalmente las carencias estructurales de una tinta con la buena printabilidad de otra, encontrándose mezclas en el estado de la técnica de casi todas las biotintas
35 existentes (Chimene, D., *et al.* Ann Biomed Eng. 2016, 44(6): 2090-2102.; (3)

utilización de tintas de sacrificio para aportar una mayor estructura y soporte a la impresión y (4) uso de materiales sintéticos como soporte.

5 Hasta la fecha, existen varias composiciones de biotintas comercialmente disponibles, como son: Gel4Cell basada en polímeros de gelatina y combinada con diferentes factores de crecimiento (Bioink Solutions, Inc.), CELLINK basada en nanocelulosa y alginato (CELLINK), Bioink y Osteoink, basadas en de PEG/Gelatina/ácido hialurónico y fosfato de calcio, respectivamente (RegenHU) y Bio127 y bioGel basadas en Pluronic F127 y Gelatina metacrilada, respectivamente (Biobot). La desventaja de este tipo de biotintas radica en que es imposible asegurar su comportamiento en cada lote de producción, ya que los polímeros de gelatina que las forman se obtienen de la hidrólisis del colágeno de animales y por lo tanto no se puede asegurar su similitud.

15 Aunque se han hecho grandes progresos en el desarrollo de nuevas biotintas y sus técnicas de bioimpresión, todavía existe la necesidad de encontrar nuevos biomateriales que cumplan con todos los requisitos necesarios que exige una biotinta adecuada, tales como una buena printabilidad y fidelidad de forma. Específicamente, sería deseable desarrollar nuevos biomateriales con capacidades de gelificación o solidificación rápidas que proporcionen un ambiente protector para su impresión con células, así como biomateriales que se puedan usar a bajas concentraciones, generando propiedades biomecánicas adecuadas y una gran porosidad.

DESCRIPCIÓN DE LA INVENCION

25 La presente invención describe nuevos biopolímeros recombinantes de tipo ELR formados por monómeros de dominios presentes en la elastina natural además de monómeros que comprenden la secuencia denominada "silk" (seda) y/o monómeros que comprenden la secuencia denominada HLF que pertenece a una clase natural de proteínas denominadas *zippers*, que no son tóxicos, y por tanto, adecuados para su uso como biotintas. Específicamente, la presente invención se refiere a composiciones que comprenden dichos biopolímeros, y concretamente para su uso como biotinta para impresión 3D.

35 Los biomateriales basados en ELRs han demostrado un gran potencial en ingeniería de tejidos, debido fundamentalmente a que se caracterizan por su extraordinaria

biocompatibilidad, biodegradabilidad y propiedades mecánicas ajustables, asimismo pueden generar una gran variedad de estructuras autoensambladas tales como micelas, nanopartículas, hidrogeles, membranas o nanofibras. Dichos polímeros se utilizan actualmente en una gran variedad de aplicaciones biomédicas como: terapia

5 génica, sistemas de liberación de vacunas, biofuncionalización de superficies y como hidrogeles para aplicaciones de ingeniería de tejidos. Los ELRs permiten el crecimiento y la proliferación celular y no inducen ninguna respuesta inmune en sistemas biológicos siendo, por tanto, susceptibles de ser implantados. En el campo de la ingeniería de tejidos, estos materiales se han utilizado para la regeneración de

10 cartílago y disco intervertebral, injertos vasculares y tejidos oculares y hepáticos.

Debido a su producción mediante la tecnología del ADN recombinante, la estructura aminoacídica de los ELR puede diseñarse para modular su entrecruzamiento o su capacidad de autoensamblado siendo capaces de autoensamblarse en hidrogeles

15 físicos y/o químicos, con la subsiguiente mejora de las propiedades mecánicas, propiedad que se utilizará para favorecer su uso como biotintas en una bioimpresora 3D. Además, se pueden implementar en su secuencia otras funciones, por medio de la fusión de otras proteínas o la inclusión de dominios bioactivos como son los motivos de adhesión celular (RGD, REDV, entre otros), factores de crecimiento o

20 metaloproteinasas para favorecer la desagregación de la estructura final.

Aparte de los requisitos biológicos, los biopolímeros ELRs descritos en esta invención presentan otras peculiaridades que pueden ser empleadas para su uso como biotintas. Estos materiales manifiestan una capacidad de respuesta a la temperatura que puede

25 ser explotada para la bioimpresión 3D: debido al rápido cambio conformacional que el polímero sufre por encima de una cierta temperatura, el polímero es capaz de mantener un estado líquido en el cartucho de la impresora, cambiando de forma rápida a un estado gel cuando se deposita sobre una placa calefactada. Su inyección, por tanto, se produce en estado líquido y con bajas viscosidades, reduciendo el esfuerzo

30 aplicado sobre la aguja, lo que facilita su deposición y protege a las células de la posible rotura de su membrana. Este comportamiento, denominado "Transición Inversa con la Temperatura" o "*Inverse Temperature Transition (ITT)*", se caracteriza por una temperatura de transición, T_t , que depende de la polaridad media polimérica, pudiendo ser modulada a través de la variación de la composición aminoacídica

35 presente en la secuencia de los biopolímeros ELRs. Así, las composiciones de la

invención, que comprenden los biopolímeros aquí descritos, gracias a la propiedad ITT las hace pasar de un estado hidratado y desordenado cuando se encuentran por debajo de su temperatura T_t , a un plegamiento hidrofóbico ordenado cuando se sobrepasa esa T_t . La utilización de esta propiedad única permite el uso de dichas composiciones como biotintas ya que son capaces de generar filamentos poliméricos depositables bajo un sistema de extrusión con temperatura controlada. Dichos filamentos se depositan con alta precisión y permiten la formación de matrices estructurales que muestran fidelidad de forma en el tiempo y en el espacio, permitiendo diseñar estructuras complejas, capa a capa, con gran versatilidad, fiabilidad y reproducibilidad.

Los biopolímeros que forman parte de la composición descrita en la presente invención, comprenden diferentes monómeros de tipo ELR, junto con monómeros que comprenden secuencias de refuerzo para la gelificación, preferiblemente monómeros que comprenden la secuencia denominada HLF que pertenece a una clase natural de proteínas denominadas *zippers*, y monómeros que comprenden secuencias de refuerzo para la estructura, preferiblemente monómeros que comprenden la secuencia denominada "silk" (seda) procedente de gusanos de seda.

Los monómeros de tipo ELR utilizados en la presente invención para la obtención de los biopolímeros descritos se basan todos ellos en la utilización del mismo dominio de tipo elastina VPGXG (SEQ ID NO: 7), donde X puede ser cualquier aminoácido excepto el aminoácido L-prolina, siendo preferidos los aminoácidos valina, ácido glutámico e isoleucina. Entre los monómeros de tipo ELR utilizados en la presente invención se encuentran los monómeros B.

El monómero B es hidrofílico y presenta una composición diseñada para no transicionar en el rango de las temperaturas fisiológicas. A efectos de la presente invención el monómero B comprende repeticiones del peptapéptido VPGXG (SEQ ID NO: 7), más específicamente el monómero B comprende repeticiones de los peptapéptidos VPGVG (SEQ ID NO: 7) y VPGEV (SEQ ID NO: 7), más específicamente aún, el monómero B comprende la secuencia SEQ ID NO: 2 $[(VPGVG)_2(VPGEV)(VPGVG)_2]$.

El monómero C es hidrofóbico y presenta una composición diseñada para producir una

transición y provocar un entrecruzamiento físico inicial a temperaturas por debajo de la temperatura fisiológica. A efectos de la presente invención el monómero C comprende repeticiones del peptapéptido VGIPG (SEQ ID NO: 3), más específicamente el monómero C en los biopolímeros de la invención comprende de entre 2 a 250
5 repeticiones de la SEQ ID NO: 3, más específicamente de 40 a 80 repeticiones de la SEQ ID NO: 3, más específicamente aún, comprende 60 repeticiones de la secuencia SEQ ID NO: 3.

Entre los monómeros utilizados para mejorar la gelificación del biopolímero de la
10 invención se encuentra el monómero Y que comprende una combinación entre la secuencia polimérica anfífilica del dominio de tipo elastina y la secuencia denominada "silk" procedente del gusano de seda *Bombix mori* (SEQ ID NO: 8; GAGAGS). A efectos de la presente invención, el monómero Y comprende repeticiones de la secuencia aminoacídica SEQ ID NO: 8, más preferiblemente, el monómero Y
15 comprende de entre 1 a 15 repeticiones de la SEQ ID NO: 8, más preferiblemente 5 repeticiones. En otra realización más preferida, el monómero Y comprende la secuencia aminoacídica según se define en la SEQ ID NO: 5.

Entre los monómeros utilizados para mejorar la estructura del biopolímero de la
20 invención se encuentra el monómero X que comprende secuencias de refuerzo para los biopolímeros de la invención. Dicho monómero X comprende la secuencia de aminoácidos del motivo estructural "zipper" que es una secuencia aminoacídica conocida como HLF y que pertenece a una clase natural de proteínas denominadas *zippers*, preferiblemente dicho motivo *zipper* pertenece a la clase de proteínas
25 naturales *zippers* humanas. A efectos de la presente invención, el monómero X comprende una secuencia aminoacídica según se define en la SEQ ID NO: 4.

Los biopolímeros descritos en la presente invención comprenden por tanto, diferentes repeticiones de los monómeros descritos anteriormente, para dar lugar a biopolímeros
30 útiles como biotintas para impresión 2D y/o 3D.

Así, en un primer aspecto, la presente invención se refiere a una composición que comprende un biopolímero que comprende las secuencias aminoacídicas que forman los monómeros B, C y al menos el monómero X, Y o ambos.

35

Tal y como se muestra en los ejemplos incluidos en el presente documento, la composición de la invención, que comprende al menos un biopolímero recombinante formado por los monómeros descritos anteriormente es útil para su uso como biotinta cuando dicha composición preferiblemente comprende un biopolímero que además de los monómeros de tipo ELR (B y C) comprende en su secuencia una combinación de los monómeros X e Y, o incluso una combinación de biopolímeros donde el primero de los biopolímeros comprende en su secuencia además de los monómeros de tipo ELR (B y C) comprende el monómero X y el segundo biopolímero comprende en su secuencia además de los monómeros de tipo ELR (B y C) el monómero Y. Así, la inclusión en el biopolímero del monómero X que comprende el dominio *zipper* junto con el resto de monómeros hace que las interacciones anfífilas del hidrogel físico formado, se estabilizan mediante la formación de interacciones *coiled-coil* procedentes de la cremallera de la secuencia del dominio *zipper*. Este fenómeno se observa físicamente, dado que la transición propia de los monómeros de tipo ELR con la temperatura se ve acelerada y reforzada gracias a dichas interacciones “*zipper*”, por lo que la composición de la invención al ser usada como biotinta muestra una buena printabilidad en forma de filamentos depositables, y una buena estabilidad a corto plazo. En cambio, tal y como se puede observar en los ejemplos (ver Ejemplo 4) si la composición comprende exclusivamente un biopolímero que comprende además de los monómeros ELR el monómero X, dicha estabilidad puede no mantenerse con el tiempo, debido a la reversibilidad de las interacciones.

Por otro lado, la inclusión del monómero Y que comprende la secuencia *silk* junto con el resto de monómeros que forman la composición de la invención, forman un biopolímero en forma de hidrogel a través de entrecruzamientos físicos anfífilos, y donde dicho biopolímero está estabilizado a través de la formación de láminas β procedentes de la secuencia *silk*. Esta composición que comprende los monómeros de tipo ELR y el monómero Y, sin incluir el monómero X, no permite la realización de una impresión fidedigna, dado que su extrusión a través de la jeringa de la impresora 3D no es homogénea, no forma filamentos y por tanto, no retiene la forma una vez impresa (ver Ejemplo 4). En cambio, dicha composición, tal y como se observa en el Ejemplo 4 muestra una gran estabilidad con el tiempo. En este caso, la transición que se produce a través del mecanismo de ITT, no es lo suficientemente rápida como para que el polímero depositado mantenga su estructura, puesto que las interacciones reforzantes son más lentas y por tanto eficaces en una etapa posterior a la etapa de

impresión.

Teniendo en cuenta lo anterior, la composición de la invención por tanto, comprenderá un biopolímero que comprenda los monómeros B, C, X y/o Y, más preferiblemente la
5 composición de la invención comprenderá un biopolímero que comprenda los monómeros B, C, X e Y, o alternativamente una combinación de biopolímeros donde el primero de los biopolímeros comprenda los monómeros B, C y X y el segundo de los biopolímeros comprenda los monómeros B, C e Y.

10 Teniendo en cuenta lo anteriormente mencionado, la presente invención se fundamenta en los siguientes pilares:

– Combinación de monómeros que comprenden secuencias de tipo ELR (monómeros B) y monómeros C junto con monómeros que comprenden
15 secuencias de tipo *silk* (monómero Y) y *zipper* (monómero X); o combinaciones de biopolímeros que comprenden monómeros de tipo ELR junto con monómeros *silk* (monómero Y) y biopolímeros que comprenden monómeros de tipo ELR (monómeros B) y monómeros C junto con monómeros *zipper* (monómero X). De esta manera, los monómeros X aportan la printabilidad
20 necesaria es decir la capacidad del mantenimiento inicial de la estructura, mientras que los monómeros Y aseguran que la estructura se mantenga a lo largo del tiempo.

– Las concentraciones de los biopolímeros (ver Ejemplo 3) que forman la
25 composición de la invención permiten su disolución en varios disolventes, mostrando baja viscosidad y comportamiento newtoniano (ver Ejemplo 4), por lo que facilitan su impresión en impresoras 3D, evitando la aplicación de grandes fuerzas de impresión que pueden dañar tanto la impresora como los materiales que se encuentren en disolución junto con la biotinta, así como
30 facilitando el uso de agujas que contengan menores diámetros, permitiendo la formación de filamentos más finos.

– Las composiciones de la invención permiten su uso en impresión 2D y/o 3D
35 con muy buena fidelidad de forma (ver Ejemplos 4 y 6). Permiten además, ser utilizadas para la impresión de soportes y encapsulación de gran variedad de

principios activos y células, siendo por tanto útiles en biomedicina, por ejemplo, aunque sin limitarnos, en medicina regenerativa, por ejemplo, para el crecimiento celular *in vitro* o *in vivo* en procedimientos de terapia celular para la regeneración tisular. Para ello, las células y/o principios activos están, preferiblemente, dispersos homogéneamente en las composiciones de la invención, de manera que tras su impresión, queden repartidos predeterminadamente en la matriz y permitan una liberación controlada del principio activo o bien 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.

– La deposición de estas composiciones como biotintas sobre la superficie de impresión se realiza controladamente a través de un diseño previamente estipulado por el inventor a través de un software específico. El proceso de impresión requiere el mantenimiento del cabezal de extrusión a baja temperatura, por debajo de la Tt de la composición, mientras que la temperatura de la cama calefactora se mantiene por encima de la Tt de la composición. De esta manera, la composición en disolución de la jeringa transiciona justo cuando es depositado, de manera que pasa de un estado desorganizado y líquido cuando se encuentra en la aguja, a un estado de hidratación hidrófoba ordenado cuando es dispensada en la cama, logrando así la formación de filamentos sobre la cama, que pueden depositarse capa a capa, manteniendo la estructura.

– Además, la composición de la invención puede comprender además al menos otro monómero D, donde dicho monómero D comprende secuencias de dominios bioactivos, tales como por ejemplo motivos de adhesión celular de tipo RGD, REDV, factores de crecimiento como el VEGF o metaloproteinasas que favorezcan la disgregación controlada de las estructuras formadas, etc. El hecho de introducir en los biopolímeros que comprenden la composición de la invención este tipo de dominios bioactivos permite diseñar estructuras con diferentes funcionalidades y bioactividades, dirigidas a la inclusión de por ejemplo, secuencias de unión celular específicas, recombinantemente introducidas en su secuencia, no existiendo esta posibilidad en ninguna biotinta existente actualmente. La introducción de diferentes secuencias

predeterminará, por ejemplo, el comportamiento celular sobre las estructuras pudiendo llegar a generar matrices con zonas celulares bien diferenciadas, propiedad necesaria para el diseño mimético de tejidos o microórganos que puedan ser implantados.

5

Por tanto, en un primer aspecto, la presente invención se refiere a una composición que comprende un biopolímero que comprende los monómeros B, C y al menos el monómero X, Y o ambos, donde,

10 B es una secuencia aminoacídica formada a base de repeticiones del dominio de tipo ELR (SEQ ID NO: 7), tal y como se ha mencionado anteriormente, más preferiblemente, el monómero B comprende la SEQ ID NO: 2,

C es una secuencia aminoacídica formada a base de repeticiones de un dominio de tipo ELR, más preferiblemente, el monómero C comprende la SEQ ID NO: 3,

15 X es una secuencia aminoacídica que comprende el motivo estructural “zipper”, más preferiblemente, el monómero X comprende la SEQ ID NO: 4, e

20 Y es una secuencia aminoacídica que comprende una combinación entre la secuencia del dominio de tipo elastina y la secuencia denominada “silk” procedente del gusano de seda *Bombix mori* (SEQ ID NO: 8; GAGAGS), más preferiblemente, el monómero Y comprende la SEQ ID NO: 5.

En otra realización preferida, la composición de la invención comprende además el monómero D. Más preferiblemente, el monómero D es una secuencia de unión celular que comprende al menos un péptido que se selecciona de la lista que consiste en:

25 RGD (Arg-Gly-Asp), como dominio de adhesión celular del receptor de integrinas $\alpha v \beta 3$, $\alpha 5 \beta 1$ y $\alpha 11 \beta 3$ (SEQ ID NO: 9), LDT (SEQ ID NO: 27), SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 17, SEQ ID NO: 18 o SEQ ID NO: 19, o un dominio de unión a heparina o un dominio de unión a azúcares derivado de lectina, aglutinina, factores de crecimiento, metaloproteinasas, además de las secuencias GTAR (SEQ ID NO: 28) y DRIR (SEQ

30 ID NO: 29) que pertenecen a la enzima uPA (*urokinase plasminogen activator system*) y otras secuencias similares que favorecen la degradación proteica. Preferiblemente, el monómero D comprende el dominio RGD (SEQ ID NO: 9) y es preferiblemente la SEQ ID NO: 6.

35 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. El dominio REDV (SEQ ID NO: 10), 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: 18 está presente en la laminina y es reconocida por diversos tipos celulares, SEQ ID NO: 19 es reconocida por neuritas, es decir, cualquier expansión del soma de una neurona, ya sea una dendrita o un axón. Estas secuencias, que forman parte del biopolímero de la invención, son reconocidas por sus respectivos tipos celulares y propician su unión. Los biopolímeros que contengan SEQ ID NO: 10 o SEQ ID NO: 19 se pueden emplear en la generación de tejidos.

Adicionalmente, los biopolímeros de la invención, pueden comprender opcionalmente un monómero adicional, monómero A, que puede estar unido a su extremo 5' y que es el resultado de la transcripción de una secuencia nucleotídica iniciadora. Así, el monómero A puede comprender la SEQ ID NO: 20, que es el resultado de la transcripción de la secuencia nucleotídica SEQ ID NO: 1.

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

En una realización preferida, los monómeros que forman parte de los biopolímeros de la invención pueden estar unidos entre sí directamente, o mediante secuencias que facilitan su unión denominadas polipéptidos espaciadores o linkers.

Así, a efectos de la presente invención, el término “linker” o “polipéptido espaciador”, se refiere a una secuencia de aminoácidos corta, preferiblemente, de hasta 20 aminoácidos de longitud, más preferiblemente, de hasta 15 aminoácidos de longitud, más preferiblemente de hasta 10 aminoácidos de longitud, y aún más preferiblemente, de hasta 5 aminoácidos de longitud, situada entre las secuencias de aminoácidos de los monómeros B, C, X, Y y/o D que forman los biopolímeros de la invención según se describen de manera general o en las fórmulas (I) o (II) definidas más adelante, permitiendo la unión entre los diferentes monómeros. Ventajosamente, dicho polipéptido espaciador es un péptido con flexibilidad estructural, tal como un péptido que da lugar a un dominio no estructurado. Prácticamente cualquier péptido con flexibilidad estructural puede ser utilizado como péptido espaciador; no obstante, ejemplos ilustrativos, no limitativos, de dichos péptidos espaciadores incluyen péptidos que contienen repeticiones de restos de aminoácidos, e.g., de Val, Gly y/o Ser, o cualquier otra repetición adecuada de restos de aminoácidos.

En otra realización preferida, la composición de la invención se caracteriza por que el biopolímero que la comprende tiene la estructura (I):



donde B, C y D son los monómeros descritos anteriormente,
 Z se selecciona entre los monómeros X e Y definidos anteriormente,
 b tiene valores de entre 5 y 15,
 c tiene valores de entre 50 y 70;
 z tiene valores de entre 1 y 5
 n tiene valores de entre 1 y 5, y
 d tiene valores de entre 0 y 3.

En otra realización preferida de la composición de la invención, más específicamente de la composición que comprende el biopolímero con estructura (I), el monómero Z es la SEQ ID NO: 4.

En otra realización preferida de la composición de la invención, más específicamente de la composición que comprende el biopolímero con estructura (I), el monómero Z es

la SEQ ID NO: 5.

En una realización más preferida, la composición de la invención se caracteriza por que comprende una combinación de biopolímeros de estructura (I) donde el primer
 5 biopolímero comprende el monómero Z de SEQ ID NO: 4 y se encuentra en dicha composición a una concentración de al menos un 20% en peso, preferiblemente de entre un 20 a un 40% en peso, más preferiblemente al menos un 40% en peso, y el segundo biopolímero comprende el monómero Z de SEQ ID NO: 4 y se encuentra en la composición a una concentración de al menos un 60% en peso, preferiblemente de
 10 entre un 60% a un 80% en peso.

En otra realización preferida de la composición de la invención, esta se caracteriza por que el biopolímero que la comprende tiene la estructura (II):

15
$$Z1_z-[(B_b-C_c)-Z2_z]_n-D_d,$$

donde B, C y D se han definido previamente,

Z1 es una secuencia aminoacídica que comprende el motivo estructural "zipper", más preferiblemente, comprende el monómero X, más preferiblemente aún comprende la
 20 SEQ ID NO: 4, y

Z2 es una secuencia aminoacídica que comprende que comprende el motivo estructural "silk", más preferiblemente, comprende el monómero Y, más preferiblemente aún comprende la SEQ ID NO: 5,

b, c, z, n y d se han definido previamente.

25

En otra realización preferida de la composición de la invención, esta se caracteriza por que b tiene un valor de 10, c tiene un valor de 60, z tiene un valor de 1, n tiene un valor de 2 y d tiene un valor de 0 o 1.

30 En otra realización preferida, la composición de la invención comprende al menos uno de los biopolímeros con estructura (I) que se seleccionan de la lista que consiste en: SEQ ID NO: 12, SEQ ID NO: 13, SEQ ID NO: 14, SEQ ID NO: 15 o combinaciones de los mismos.

35 En otra realización preferida, la composición de la invención comprende una

combinación de biopolímeros de estructura (I) donde el primer biopolímero comprende una secuencia que se selecciona de la lista que consiste en: SEQ ID NO: 12 o SEQ ID NO: 15, más preferiblemente la SEQ ID NO: 15, y el segundo biopolímero comprende una secuencia que se selecciona de la lista que consiste en: SEQ ID NO: 13 o SEQ ID NO: 14, más preferiblemente la SEQ ID NO: 14.

En otra realización más preferida, la composición de la invención comprende el biopolímero de SEQ ID NO: 16.

En otra realización preferida, la composición de la invención puede comprender además, células, moléculas bioactivas, principios activos o combinaciones de los mismos.

En la Tabla 1 se muestran los diferentes biopolímeros descritos en la presente invención, junto con cada uno de los monómeros que los comprenden y la estructura de cada uno.

Tabla 1. Caracterización de los biopolímeros de la invención.

Nombre	Estructura	Secuencia	SEQ ID NO:
Polímero 2 (101696 Da)	$\{(B_{10}-C_{60})-Y\}_2$	$\{[(VPGVG)_2-(VPGEG)-(VPGVG)_{20}[VGIPG]_{60}-[V(GAGAGS)_5G]_2)_2$	12
Polímero 3 (104119 Da)	$\{(B_{10}-C_{60})-X\}_2$	$\{[(VPGVG)_2-(VPGEG)-(VPGVG)_{20}[VGIPG]_{60}-[VGGGGGKENQIAIRASFLEKENSALRQEVADLRKELGKCKNILAKYEAGGGGG]_2$	13
Polímero 4 (123345 Da)	$\{(B_{10}-C_{60})-X\}_2-D$	$\{[(VPGVG)_2-(VPGEG)-(VPGVG)_{20}[VGIPG]_{60}-[VGGGGGKENQIAIRASFLEKENSALRQEVADLRKELGKCKNILAKYEAGGGGG]_2-(VPGIG)_5AVTGRGDSPASS)_6-V$	14
Polímero 5 (120921 Da)	$\{(B_{10}-C_{60})-Y\}_2-D$	$\{[(VPGVG)_2-(VPGEG)-(VPGVG)_{20}[VGIPG]_{60}-[V(GAGAGS)_5G]_2-(VPGIG)_5AVTGRGDSPASS)_6-V$	15

Nombre	Estructura	Secuencia	SEQ ID NO:
Polímero 6 (126393 Da)	$X-\{(B_{10}-C_{60})-Y\}_2-D$	[VGGGGGKQENQIAIRASFLEK ENSALRQEVDLRKELGKCK NILAKYEAGGGGG]- {[(VPGVG) ₂ -(VPGE) ₂]- (VPGVG) ₂] ₁₀ [VGIPG] ₆₀]- [V(GAGAGS) ₅ G] ₂]- ([VPGIG] ₅ AVTGRGDSPASS) ₆ - V	16

Un segundo aspecto de la presente invención se refiere a un ácido nucleico que comprende una secuencia nucleotídica que codifica para la secuencia aminoacídica del biopolímero del primer aspecto de la invención.

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

Tal y como se ha mencionado anteriormente, las secuencias nucleotídicas que codifican para los monómeros B, C, X, Y, y/o D que comprenden los biopolímeros de la invención, pueden estar unidas entre sí directamente, o mediante polipéptidos espaciadores o linkers. A efectos de la presente invención, la secuencia

polinucleotídica que codifica para cada uno de los biopolímeros de la invención, puede por tanto, comprender linkers.

En una realización preferida, las secuencias nucleotídicas que codifican para cada uno
5 de los biopolímeros de la invención se seleccionan de la lista que consiste en: SEQ ID
NO: 21, que codifica para el biopolímero 1 que comprende la SEQ ID NO: 11; la SEQ
ID NO: 22 que codifica para el biopolímero 2 que comprende la SEQ ID NO: 12; la
SEQ ID NO: 23 que codifica para el biopolímero 3 que comprende la SEQ ID NO: 13;
la SEQ ID NO: 24 que codifica para el biopolímero 4 que comprende la SEQ ID NO:
10 14; la SEQ ID NO: 25 que codifica para el biopolímero 5 que comprende la SEQ ID
NO: 15 y la SEQ ID NO: 26 que codifica para el biopolímero 6 que comprende la SEQ
ID NO: 16.

El ácido nucleico de la presente invención puede tener unido a su extremo 5' una
15 secuencia nucleotídica que sirva de secuencia iniciadora de la transcripción. La
secuencia puede ser, pero sin limitarse, la secuencia nucleotídica SEQ ID NO: 1, que
codifica en cada biopolímero de la invención para la secuencia aminoacídica SEQ ID
NO: 20, también denominado monómero A en la estructura final de cada biopolímero.
Asimismo, el ácido nucleico de la presente invención puede tener unido a su extremo
20 3' una secuencia de terminación de la transcripción como por ejemplo, pero sin
limitarse, la secuencia GTATGA.

La secuencia nucleotídica que codifica para la secuencia aminoacídica de los
biopolímeros que forman parte de la composición de la presente invención, se inserta
25 en un vector de expresión. Así, un aspecto más de la presente invención se refiere a
un vector de expresión que comprende el ácido nucleico de la invención.

A efectos de la presente invención, el término "vector de expresión" se refiere a un
fragmento de ADN que tiene la capacidad de replicarse en un determinado huésped y,
30 como el término indica, puede servir de vehículo para multiplicar otro fragmento de
ADN que haya sido fusionado al mismo (inserto). Inserto se refiere a un fragmento de
ADN que se fusiona al vector; en el caso de la presente invención, el vector puede
comprender cualquiera de las secuencias nucleotídicas que codifican para cualquiera
de los biopolímeros de la invención, fusionadas al mismo, que puede replicarse en el
35 huésped adecuado. Los vectores pueden ser plásmidos, cósmidos, bacteriófagos o

vectores virales, sin excluir otro tipo de vectores que se correspondan con la definición realizada de vector.

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

10 La expresión del ácido nucleico en la célula de la invención da lugar a un biopolímero que puede ser purificado mediante técnicas conocidas en el estado de la técnica, como ya se ha mencionado anteriormente.

15 Un tercer aspecto de la presente invención se refiere a una célula aislada transfectada con el ácido nucleico del segundo aspecto de la invención.

El término "célula" tal como se entiende en la presente invención hace referencia a una célula procariótica o eucariótica. La célula puede ser una bacteria capaz de replicar un ADN ajeno transformado como por ejemplo cualquiera de las cepas de la especie
20 *Escherichia coli* o una bacteria capaz de transferir el ADN de interés al interior de una planta como por ejemplo *Agrobacterium tumefaciens*. Preferiblemente, la célula hace referencia a una célula eucariótica vegetal y dentro de este grupo, más preferiblemente, a aquellas células pertenecientes al reino Plantae. Así pues, en el caso de que la célula sea vegetal, el término célula comprende, al menos, una célula
25 del parénquima, célula meristemática o de cualquier tipo, diferenciada o indiferenciada. Asimismo, también se incluye en esta definición un protoplasto (célula de una planta que carece de pared celular).

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

Una vez establecida su secuencia, los biopolímeros que comprenden la composición de la invención, pueden ser objeto de tratamientos adicionales tales como procesos de homogeneización y purificación, ampliamente conocidos en el estado de la técnica, que ayuden a obtener el nivel de citocompatibilidad deseado, permitiendo su uso combinado con células u otras moléculas bioactivos y/o componentes con diferentes actividades diagnósticas. Asimismo, pueden procesarse a través de diferentes etapas mecánicas, enzimáticas y/o químicas para alcanzar las propiedades poliméricas deseadas, tanto morfológicas como físicas. También se utilizarán varios procesos de caracterización para asegurar su uso en perfectas condiciones, como son el análisis de su composición aminoacídica, caracterizaciones físicas o el análisis reológico de las biotintas formadas por las composiciones descritas en la presente invención.

Un cuarto aspecto de la presente invención se refiere al uso de la composición de la invención como biotinta, preferiblemente como biotinta para impresión 3D.

Un quinto aspecto de la presente invención se refiere a la biotinta que comprende la composición según se describe en la presente invención.

A efectos de la presente invención, las biotintas se preparan utilizando componentes estériles y asegurando siempre su uso bajo condiciones de esterilidad. Los diferentes biopolímeros diseñados para formar las biotintas descritas, pueden ser impresos con células o sin células, y también se pueden usar como soporte para otras biotintas tales como materiales preparados a partir de tejidos y órganos descelularizados.

Un sexto aspecto de la presente invención se refiere a un biomaterial 3D que comprende la composición de la invención.

En cualquiera de las realizaciones descritas aquí, las composiciones, biotinta y biomateriales descritas en la invención pueden incluir además uno o más agentes (por ejemplo, excipientes, aditivos, principios activos, agentes biológicamente activos, etc.) adecuados para los fines previstos, que incluyen agentes terapéuticos (por ejemplo, agentes biológicamente activos) y muestras biológicas. Típicamente, se dice que la adición de tales agentes "funcionaliza" la composición, biotinta o biomaterial, proporcionando funcionalidad añadida. Ejemplos no limitantes de dichos agentes

adecuados para ser añadidos para la funcionalización de las composiciones, biotintas y biomateriales de la invención, incluyen, pero no se limitan a: partículas conductoras o metálicas; partículas inorgánicas; tintes/pigmentos; fármacos o principios activos (por ejemplo, antibióticos, moléculas pequeñas o compuestos orgánicos de bajo peso molecular); proteínas y fragmentos o complejos de los mismos (por ejemplo, enzimas, antígenos, anticuerpos y fragmentos de unión a antígeno de los mismos); células y fracciones de las mismas (virus y partículas virales, células procariontas tales como bacterias, células eucariotas tales como células de mamíferos y células vegetales, hongos).

10

El término "agente biológicamente activo" como se usa en el presente documento se refiere a cualquier molécula que ejerce al menos un efecto biológico *in vitro* o *in vivo*. Por ejemplo, el agente biológicamente activo puede ser un agente terapéutico para tratar o prevenir un estado o condición de enfermedad en un sujeto. Los agentes biológicamente activos incluyen, sin limitación, moléculas orgánicas, materiales inorgánicos, proteínas, péptidos, ácidos nucleicos (por ejemplo, genes, fragmentos de genes, secuencias reguladoras de genes y moléculas antisentido), nucleoproteínas, polisacáridos, glicoproteínas y lipoproteínas. Las clases de compuestos biológicamente activos que pueden incorporarse en la composición descrita en la presente incluyen, sin limitación, agentes anticancerígenos, antibióticos, analgésicos, agentes antiinflamatorios, inmunosupresores, inhibidores de enzimas, antihistamínicos, anticonvulsivos, hormonas, relajantes musculares, antiespasmódicos, oftálmicos agentes, prostaglandinas, antidepresivos, sustancias antipsicóticas, factores tróficos, proteínas osteoinductivas, factores de crecimiento y vacunas.

25

En algunas realizaciones, el aditivo es un agente terapéutico. Como se usa en este documento, el término "agente terapéutico" significa una molécula, grupo de moléculas, complejo o sustancia administrada a un organismo con fines de diagnóstico, terapéuticos, médicos preventivos o veterinarios. Como se usa en este documento, el término "agente terapéutico" incluye un "fármaco" o una "vacuna". Este término también puede incluir específicamente ácidos nucleicos y compuestos que comprenden ácidos nucleicos que producen un efecto terapéutico.

35

El término "agente terapéutico" también incluye un agente que es capaz de proporcionar un efecto biológico, fisiológico o terapéutico local o sistémico en el

sistema biológico al que se aplica. Por ejemplo, el agente terapéutico puede actuar para controlar la infección o inflamación, potenciar el crecimiento celular y la regeneración tisular, controlar el crecimiento tumoral, actuar como analgésico, promover la unión anti-célula y potenciar el crecimiento óseo, entre otras funciones.

- 5 Otros agentes terapéuticos adecuados pueden incluir agentes antivirales, hormonas, anticuerpos o proteínas terapéuticas. Otros agentes terapéuticos incluyen profármacos, que son agentes que no son biológicamente activos cuando se administran pero, tras la administración a un sujeto, se convierten en agentes biológicamente activos a través del metabolismo o algún otro mecanismo.
- 10 Adicionalmente, una composición de suministro de fármaco a base de seda puede contener un agente terapéutico o combinaciones de dos o más agentes terapéuticos.

En algunas realizaciones, el agente estimula la formación de tejido, y/o la curación y el recrecimiento de tejidos naturales, y cualquier combinación de los mismos. Los

15 agentes que aumentan la formación de nuevos tejidos y/o estimulan la curación o el recrecimiento del tejido nativo en el sitio de la inyección pueden incluir, entre otros, factores de crecimiento (factor de crecimiento de fibroblastos (FGF), factor de crecimiento transformante beta (TGF-beta, plaquetas). factor de crecimiento derivado (PDGF), factores de crecimiento epidérmico (EGF), péptidos activados por el tejido

20 conectivo (CTAP), factores osteogénicos que incluyen proteínas morfogénicas óseas, heparina, angiotensina II (A-II) y fragmentos de los mismos, factores de crecimiento tipo insulina, factores de necrosis tumoral, interleucinas, factores estimuladores de colonias, eritropoyetina, factores de crecimiento nervioso, interferones, análogos biológicamente activos, fragmentos y derivados de tales factores de crecimiento, y

25 cualquier combinación de los mismos.

En algunas realizaciones, el agente es un agente de curación o cicatrización de heridas. Como se usa en el presente documento, un "agente de curación o cicatrización de heridas" es un compuesto o composición que promueve activamente

30 el proceso de cicatrización de heridas.

En ciertas realizaciones, los agentes activos descritos en este documento son inmunógenos. En una realización, el inmunógeno es una vacuna.

35 En algunas realizaciones, el agente puede ser una célula, por ejemplo, una célula

biológica. Las células útiles para la incorporación en la composición pueden provenir de cualquier fuente, por ejemplo, mamífero, insecto, planta, etc. En algunas realizaciones, la célula puede ser una célula humana, células de primate, células de mamífero, células de roedor, etc., preferiblemente una célula humana. En algunas realizaciones, la célula puede ser una célula genéticamente modificada. Una célula puede modificarse genéticamente para expresar y secretar un compuesto deseado, por ejemplo, un agente bioactivo, un factor de crecimiento, un factor de diferenciación, citoquinas y similares. Los métodos para modificar genéticamente células para expresar y secretar compuestos de interés son conocidos en la técnica y son fácilmente adaptables por un experto en la técnica.

En algunas realizaciones, las composiciones, biotintas y biomateriales de la invención pueden incluir un colorante, tal como un pigmento o tinte o una combinación de los mismos. Se pueden incluir pigmentos y colorantes orgánicos y/o inorgánicos, fluorescentes, etc.

Por lo tanto, a la vista de lo descrito anteriormente, otro aspecto de la presente invención se refiere a la composición, biotinta y biomaterial según se describen en la misma para su uso como medicamento.

Otro aspecto de la presente invención se refiere a la composición, biotinta y biomaterial según se describen en la presente invención para su uso en regeneración tisular, así como para la generación de tejidos que simulen patologías, que sirvan como modelos de enfermedades, o que contengan defectos para el testaje de nuevos compuestos terapéuticos y/o profilácticos, evitando así la utilización de modelos animales.

Otro aspecto de la presente invención se refiere a un método para la obtención de la composición de la invención, que comprende las siguientes etapas:

- (a) cultivar la célula del tercer aspecto de la invención en las condiciones adecuadas para la expresión del ácido nucleico del segundo aspecto de la invención.
- (b) purificar el biopolímero codificado por dicho ácido nucleico.

El grado de complejidad composicional impuesto por las necesidades del diseño

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

5

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

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

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

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

25 BREVE DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

FIG. 1. Electroforesis en gel de acrilamida del biopolímero 1 con el marcador de peso molecular en el carril de la izquierda y el biopolímero 1 en el carril de la derecha. Los pesos moleculares se indican en kilodaltons (kDa).

30 **FIG. 2.** Análisis de espectroscopía de masas (MALDI-ToF, del inglés "*Matrix-assisted laser desorption/ionization- time of flight*") del biopolímero 1 en el cual se muestra el valor de su Masa Molecular experimental de 92897 Da, siendo el teórico 93175 Da y la diferencia entre ambos atribuible al error de medida. También se observa el carácter monodisperso de la molécula, apareciendo solo un estrecho pico.

35 **FIG. 3.** Análisis de espectroscopía de infrarrojos (FTIR-ATR, del inglés "*Fourier*

Transform Infrared - Attenuated Total Reflectance”) del biopolímero 1 en el cual se muestran las señales características de los grupos amida ($\sim 1700\text{ cm}^{-1}$) presentes en los biopolímeros proteicos diseñados.

5 **FIG. 4.** Análisis de Resonancia Magnética Nuclear (RMN) del biopolímero 1 en el cual se observa la señal de los hidrógenos pertenecientes al grupo amina NH (7,5 - 8,5 ppm) al grupo metilo CH_3 (0,5 - 1,0 ppm) y al grupo metileno CH (1,0 - 2,3; 3,5 - 4,5ppm).

FIG. 5. Electroforesis en gel de acrilamida del biopolímero 2 con el marcador de peso molecular en el carril de la derecha y el biopolímero 2 en el carril de la izquierda. Los pesos moleculares se indican en kilodaltons (kDa).

10 **FIG. 6.** Análisis de MALDI-TOF del biopolímero 2 en el cual se muestra el valor de su Masa Molecular experimental de 101664 Da, siendo el teórico 101696 Da y la diferencia entre ambos atribuible al error de medida.

FIG. 7. Análisis de FTIR-ATR del biopolímero 2 en el cual se muestran las señales características de los grupos amida ($\sim 1700\text{ cm}^{-1}$) presentes en los polímeros proteicos diseñados.

15 **FIG. 8.** Análisis de Resonancia Magnética Nuclear (RMN) del biopolímero 2 en el cual se observa la señal de los hidrógenos pertenecientes al grupo amina NH (7,5 - 8,5 ppm) al grupo metilo CH_3 (0,5 - 1,0 ppm) y al grupo metileno CH (1,0 - 2,3; 3,5 - 4,5ppm).

20 **FIG. 9.** Electroforesis en gel de acrilamida del biopolímero 3 con el marcador de peso molecular en el carril de la izquierda y el biopolímero 3 en el carril de la derecha. Los pesos moleculares se indican en kilodaltons (kDa).

FIG. 10. Análisis de MALDI-TOF del biopolímero 3 en el cual se muestra el valor de su Masa Molecular experimental de 103793 Da, siendo el teórico 104119 Da y la diferencia entre ambos atribuible al error de medida.

FIG. 11. Análisis de FTIR-ATR del biopolímero 3 en el cual se muestran las señales características de los grupos amida ($\sim 1700\text{ cm}^{-1}$) presentes en los polímeros proteicos diseñados.

30 **FIG. 12.** Análisis de Resonancia Magnética Nuclear (RMN) del biopolímero 3 en el cual se observa la señal de los hidrógenos pertenecientes al grupo amina NH (7,5 - 8,5 ppm) al grupo metilo CH_3 (0,5 - 1,0 ppm) y al grupo metileno CH (1,0 - 2,3; 3,5 - 4,5ppm).

FIG. 13. Electroforesis en gel de acrilamida del biopolímero 4 con el marcador de peso molecular en el carril de la derecha y el biopolímero 4 en el carril de la izquierda. Los

35

pesos moleculares se indican en kilodaltons (kDa).

FIG. 14. Análisis de MALDI-TOF del biopolímero 4 en el cual se muestra el valor de su Masa Molecular experimental de 122882 Da, siendo el teórico 123345 Da y la diferencia entre ambos atribuible al error de medida.

5 **FIG. 15.** Análisis de FTIR-ATR del biopolímero 4 en el cual se muestran las señales características de los grupos amida ($\sim 1700\text{ cm}^{-1}$) presentes en los polímeros proteicos diseñados.

FIG. 16. Análisis de Resonancia Magnética Nuclear (RMN) del biopolímero 4 en el cual se observa la señal de los hidrógenos pertenecientes al grupo amina NH (7,5 - 8,5 ppm) al grupo metilo CH_3 (0,5 - 1,0 ppm) y al grupo metileno CH (1,0 - 2,3; 3,5 - 4,5ppm).

10

FIG. 17. Electroforesis en gel de acrilamida del biopolímero 5 con el marcador de peso molecular en el carril de la derecha y el biopolímero 5 en el carril de la izquierda. Los pesos moleculares se indican en kilodaltons (kDa).

15 **FIG. 18.** Análisis de MALDI-TOF del biopolímero 5 en el cual se muestra el valor de su Masa Molecular experimental de 120611 Da, siendo el teórico 120921 Da y la diferencia entre ambos atribuible al error de medida.

FIG. 19. Análisis de FTIR-ATR del biopolímero 5 en el cual se muestran las señales características de los grupos amida ($\sim 1700\text{ cm}^{-1}$) presentes en los polímeros proteicos diseñados.

20

FIG. 20. Análisis de Resonancia Magnética Nuclear (RMN) del biopolímero 5 en el cual se observa la señal de los hidrógenos pertenecientes al grupo amina NH (7,5 - 8,5 ppm) al grupo metilo CH_3 (0,5 - 1,0 ppm) y al grupo metileno CH (1,0 - 2,3; 3,5 - 4,5ppm).

25 **FIG. 21.** Electroforesis en gel de acrilamida del biopolímero 6 con el marcador de peso molecular en el carril de la derecha y el biopolímero 6 en el carril de la izquierda. Los pesos moleculares se indican en kilodaltons (kDa).

FIG. 22. Análisis de MALDI-TOF del biopolímero 6 en el cual se muestra el valor de su Masa Molecular experimental de 125857 Da, siendo el teórico 126393 Da y la diferencia entre ambos atribuible al error de medida.

30

FIG. 23. Análisis de FTIR-ATR del biopolímero 6 en el cual se muestran las señales características de los grupos amida ($\sim 1700\text{ cm}^{-1}$) presentes en los polímeros proteicos diseñados.

FIG. 24. Análisis de Resonancia Magnética Nuclear (RMN) del biopolímero 6 en el cual se observa la señal de los hidrógenos pertenecientes al grupo amina NH (7,5 - 8,5

35

ppm) al grupo metilo CH₃ (0,5 – 1,0 ppm) y al grupo metileno CH (1,0 – 2,3; 3,5 – 4,5ppm).

FIG. 25. Fotografías del biomaterial impreso con la composición que comprende diferentes concentraciones (300, 250, 200, 180, 150 y 120 mg/mL) del biopolímero 5 pre-curado (SEQ ID NO: 15) que se muestran en la columna A, y del biopolímero 4 (SEQ ID NO: 14) que se muestra en la columna B, utilizando PBS1x como disolvente.

FIG. 26. Fotografías de diferentes biomateriales impresos con las diferentes composiciones de la invención a una concentración de 250 mg/mL utilizando PBS1x como disolvente, donde se pone de manifiesto la printabilidad (Columna A) y la observación fibrilar (Columna B) de dichos biomateriales. BP: Biopolímero. El porcentaje de las combinaciones de biopolímeros se refieren al porcentaje expresado en peso.

FIG. 27. Viscosidad (expresado en Pascales por segundo, Pa.s) de las biotintas formadas por diferentes biopolímeros de la invención sometidas a una velocidad (1/s) de corte ascendente.

FIG. 28. Evaluación de la variación de la viscosidad en diferentes biotintas de la invención sometida a una velocidad de corte elevada por un corto intervalo de tiempo. Paso 1: Velocidad de corte de 5 s⁻¹. Paso 2: Velocidad de corte de 1000 s⁻¹. Paso 3: Velocidad de corte de 5 s⁻¹.

FIG. 29. Efecto de la temperatura sobre la viscosidad de diferentes biotintas de la invención analizadas.

FIG. 30. Fotografías de diferentes estructuras impresas con la biotinta que comprende el biopolímero 4 (SEQ ID NO: 14) utilizando PBS1x como disolvente donde se muestra la estabilidad de las estructuras impresas a lo largo de 3 días.

FIG. 31. Fotografías de diferentes estructuras impresas con la biotinta que comprende el biopolímero 5 pre-curado (SEQ ID NO: 15) utilizando PBS1x como disolvente donde se muestra la estabilidad de las estructuras impresas a lo largo de dos días.

FIG. 32. Fotografías de diferentes estructuras impresas con la biotinta que comprende la combinación de los biopolímeros 60% en peso del biopolímero 4 (SEQ ID NO: 14) y 40% en peso del biopolímero 5 pre-curado (SEQ ID NO: 15) utilizando PBS1x como disolvente donde se muestra la estabilidad de las estructuras impresas a lo largo de 40 días.

FIG. 33. Fotografías de diferentes estructuras impresas con la biotinta que comprende el biopolímero 6 (SEQ ID NO: 16) utilizando PBS1x como disolvente donde se muestra la estabilidad de las estructuras impresas a lo largo de 40 días.

FIG. 34. Gráfico que muestra un análisis de la adhesión celular temprana a los tiempos de 30 min, 2 horas y 4 horas, de las mezclas del biopolímero 4 (60% en peso) de SEQ ID NO: 14 y del biopolímero 5 pre-curado (40% en peso) de SEQ ID NO: 15 que comprende la secuencia de adhesión RGD (bloques blancos) y de la mezcla del

5

biopolímero 3 (60% en peso) de SEQ ID NO: 13 y del biopolímero 2 (40% en peso) de SEQ ID NO: 12 que no comprenden secuencia de adhesión celular (bloques negros).

FIG. 35. Análisis de la proliferación celular a lo largo de 21 días sobre superficies impresas a base de las mezclas del biopolímero 4 (60% en peso) de SEQ ID NO: 14 y del biopolímero 5 pre-curado (40% en peso) de SEQ ID NO: 15 que comprende la

10

secuencia de adhesión RGD (Bloques blancos) y de la mezcla del biopolímero 3 (60% en peso) de SEQ ID NO: 13 y del biopolímero 2 (40% en peso) de SEQ ID NO: 12 que no comprenden secuencia de adhesión celular (bloques negros).

FIG. 36. Fotografía microscópica de una superficie impresa con la biotinta que comprende la combinación del biopolímero 4 (60% en peso) de SEQ ID NO: 14 y del

15

biopolímero 5 pre-curado (40% en peso) de SEQ ID NO: 15 utilizando PBS1x como disolvente, sobre la que se han sembrado y cultivado células HFF-1 durante 7 días. La tinción realizada con DAPI/Phalloidina muestra los núcleos celulares en azul y las fibras de actina en verde.

FIG. 37. Fotografías microscópicas de una superficie impresa con la biotinta que comprende la combinación del biopolímero 4 (60% en peso) de SEQ ID NO: 14 y del

20

biopolímero 5 pre-curado (40% en peso) de SEQ ID NO: 15 utilizando PBS1x como disolvente, sobre la que se han sembrado y cultivado células HFF-1 durante 7 días. La tinción realizada con DAPI/Phalloidina muestra los núcleos celulares en azul y las fibras de actina en verde. Se muestran diferentes planos focales para corroborar la

25

EJEMPLOS

A continuación se ilustrará la invención mediante unos ensayos realizados por los

30

inventores, que describen la síntesis de la composición de la invención, así como sus características. Los ejemplos se proporcionan para poder comprender la descripción, y no se pretende que sean limitativos de la presente invención.

35

EJEMPLO 1. Obtención y caracterización de los biopolímeros proteicos recombinantes que forman la composición de la invención.

5 El diseño y la obtención de las secuencias nucleotídicas sintéticas que codifican para las secuencias aminoacídicas de los distintos biopolímeros empleados, incluyendo los biopolímeros que comprenden la composición de la invención se realizaron como está descrito en WO/2010/092224. Igualmente, la expresión, purificación y caracterización de los biopolímeros se llevó a cabo como está descrito en WO/2010/092224.

10 Brevemente, los ELRs se diseñan y obtienen mediante tecnologías de ADN recombinante. Una vez que la secuencia nucleotídica que codifica para la proteína deseada ha sido introducida en la cepa bacteriana *Escherichia coli*, ésta se somete a un cultivo en fermentador, que permite un control absoluto de sus condiciones de producción. Cuando se alcanza la fase estacionaria en la curva de crecimiento del cultivo bacteriano, se procede a la extracción del ELR deseado mediante la lisis
15 ultrasónica de la pared bacteriana. La purificación del biopolímero se llevará a cabo aprovechando su propiedad de transición inversa con la temperatura, realizando ciclos de calentamiento y enfriamiento del debris bacteriano hasta la obtención del polímero puro.

20 Tras un proceso de eliminación de las sales a través de diálisis, todos los biopolímeros utilizados se liofilizan, mostrando una apariencia blanquecina y algodonosa, y se reservan hasta su uso en este estado a -20°C.

25 Para caracterizar los biopolímeros obtenidos, se utilizan las siguientes técnicas:

- Electroforesis en gel de acrilamida (PAGE) en presencia de SDS que permite estimar de forma aproximada el peso molecular del biopolímero además de verificar su pureza.
- Espectrometría de masas MALDI-TOF en un espectrómetro modelo Q-Star
30 para obtener el peso molecular del polímero de forma exacta.
- Espectro de resonancia magnética nuclear de protón (¹H-RMN) realizado en un espectrómetro modelo Bruker ARX300.
- Espectro de infrarrojo (FT-IR) utilizando un espectrofotómetro Cary 50.
- Cromatografía HPLC con detección UV utilizando un sistema de gradiente
35 HPLC modelo WATERS 600 con un detector WATERS 2487, que permite

determinar la composición de aminoacídica.

- Calorimetría diferencial de barrido (DSC) de soluciones acuosas del material con concentración de 50 mg/ml en un equipo Mettler Toledo 822e DSC, para obtener la temperatura de transición inversa del polímero.

5

Para demostrar la efectividad de la composición de la invención, específicamente para su uso como biotinta, se diseñaron los siguientes biopolímeros (**Tabla 2**), para posteriormente determinar cuáles son las mejores composiciones para su uso como biotintas.

10

Tabla 2. Biopolímeros, estructura y secuencias aminoacídicas y nucleotídicas:

Nombre	Estructura	Secuencia aminoacídica	Secuencia nucleotídica
Biopolímero 1 (93175 Da)	$\{(B_{10}-C_{60})\}_2-D$	SEQ ID NO: 11	SEQ ID NO: 21
Biopolímero 2 (101696 Da)	$\{(B_{10}-C_{60})-Y\}_2$	SEQ ID NO: 12	SEQ ID NO: 22
Biopolímero 3 (104119 Da)	$\{(B_{10}-C_{60})-X\}_2$	SEQ ID NO: 13	SEQ ID NO: 23
Biopolímero 4 (123345 Da)	$\{(B_{10}-C_{60})-X\}_2-D$	SEQ ID NO: 14	SEQ ID NO: 24
Biopolímero 5 (120921 Da)	$\{(B_{10}-C_{60})-Y\}_2-D$	SEQ ID NO: 15	SEQ ID NO: 25
Biopolímero 6 (126393 Da)	$X-\{(B_{10}-C_{60})-Y\}_2-D$	SEQ ID NO: 16	SEQ ID NO: 26

Biopolímero 1 (1107 aminoácidos)

15

Estructura: (A)- $\{(B_{10}-C_{60})\}_2-D$.

Secuencia aminoacídica: SEQ ID NO: 11: MESLLP- $\{[VPGVG]_2-(VPGEG)-(VPGVG)_2\}_{10}[VGIPG]_{60}\}_2-([VPGIG]_5AVTGRGDSPASS)_6-V$

Codificado por la secuencia nucleotídica SEQ ID NO: 21.

La composición de aminoácidos teórica y la obtenida mediante HPLC con detección

20

UV (luz ultravioleta) se presentan en la Tabla 3.

Tabla 3. Análisis de la composición de aminoácidos del biopolímero 1.

		Glu	Gly	Ile	Leu	Pro	Ser	Val
Análisis aminoácidos	Teórico	21	440	120	2	221	1	301
	Experimental	22,01	432,83	119,34	1,91	224,02	1,09	304,80

El rendimiento de la producción fue de 227,65 mg/L.

- El peso molecular teórico para el biopolímero 1 es de 93175 Da y se estimó experimentalmente por electroforesis en gel de poliacrilamida (**Fig. 1**) y por espectrometría de masas MALDI-TOF resultando ser de 92897 Da. Los espectros de HPLC, así como de infrarrojos (IR) y de resonancia magnética nuclear (RMN) obtenidos para el biopolímero 1 quedan recogidos en las **Figs. 2, 3 y 4**, respetivamente.
- 10 La Temperatura de transición obtenida mediante DSC en MQ a pH 7,8 fue de 19,10°C, mientras que en PBS 1X a pH 7,65 fue de 14,66°C.

Biopolímero 2 (1233 aminoácidos)

- 15 Estructura: (A)-{(B₁₀-C₆₀)-Y}₂
 Secuencia aminoacídica SEQ ID NO: 12: MESLLP-{{{(VPGVG)₂-(VPGEG)-(VPGVG)₂}}₁₀[VGIPG]₆₀}-[V(GAGAGS)₅G]₂}₂
 Codificado por la secuencia nucleotídica SEQ ID NO: 22.
 La composición de aminoácidos teórica y la obtenida mediante HPLC con detección UV (luz ultravioleta) se presentan en la Tabla 4.
- 20

Tabla 4: Análisis de la composición de aminoácidos del biopolímero 2.

		Ala	Glu	Gly	Ile	Leu
Análisis amino-ácidos	Teórico	40	21	504	120	2
	Experimental	33,17	24,57	501,30	122,87	2,46
		Met	Pro	Ser	Val	
Análisis amino-ácidos	Teórico	1	221	21	305	
	Experimental	1,72	232,22	17,20	294,39	

El rendimiento de la producción fue de 178,9 mg/L.

El Peso Molecular teórico para el polímero 2 es de 101696 Da y se estimó experimentalmente por electroforesis en gel de poliacrilamida (**Fig. 5**) y por espectrometría de masas MALDI-TOF (**Fig. 6**) resultando ser de 101664 Da. Los espectros de IR y de RMN obtenidos para el biopolímero 2 quedan recogidos en las **Figs. 7 y 8**, respetivamente.

La Temperatura de transición obtenida mediante DSC en MQ a pH 6,14 fue de 20,08°C, mientras que en PBS1X a pH 6,40 fue de 16,92°C.

10 Biopolímero 3 (1213 aminoácidos)

Estructura: (A)-{(B₁₀-C₆₀)-X}₂

Secuencia aminoacídica SEQ ID NO: 13: MESLLP-{{VPGVG}₂-(VPGEG)-(VPGVG)₂}}₁₀[VGIPG]₆₀-

15 [VGGGGGKKNQIAIRASFLEKENSALRQEVADLRKELGKCKNILAKYEAGGGGG]₂

Codificado por la secuencia nucleotídica SEQ ID NO: 23.

La composición de aminoácidos teórica y la obtenida mediante HPLC con detección UV (luz ultravioleta) se presentan en la Tabla 5.

20 **Tabla 5:** Análisis de la composición de aminoácidos del biopolímero 3.

		Ala	Arg	Asn	Asp	Cys	Glu	Gln	Gly	Ile
Análisis amino-ácidos	Teórico	12	6	6	2	2	33	4	462	126
	Experimental	12,17	5,35	6,17	1,94	0,97	33,53	4,51	468,61	136,08
		Leu	Lys	Met	Phe	Pro	Ser	Tyr	Val	
Análisis amino-ácidos	Teórico	12	12	1	2	221	5	2	305	
	Experimental	11,44	10,20	1,72	2,70	238,81	5,68	2,72	273,06	

El rendimiento de la producción fue de 517,22 mg/L.

El Peso Molecular teórico para el polímero F es de 104119 Da y se estimó experimentalmente por electroforesis en gel de poliacrilamida (**Fig. 9**) y por espectrometría de masas MALDI-TOF (**Fig. 10**) resultando ser de 103.793 Da. Los espectros de IR y de RMN obtenidos para el biopolímero 3 quedan recogidos en las

Figs. 11 y 12, respetivamente.

La Temperatura de transición obtenida mediante DSC en MQ a pH 7,5 fue de 15,30 °C mientras que en PBS1X a pH 7,5 fue de 14,18°C.

5 **Biopolímero 4 (1435 aminoácidos)**

Estructura: (A)-{(B₁₀-C₆₀)-X}₂-D

Secuencia aminoacídica SEQ ID NO: 14: MESLLP-{{VPGVG}}₂-(VPGEG)-
(VPGVG)₂]₁₀[VGIPG]₆₀-

[VGGGGGKENQIAIRASFLEKENSALRQEVADLRKELGKCKNILAKYEAGGGGGG]}₂-

10 ([VPGIG]₅AVTGRGDSPASS)₆-V

Codificado por la secuencia nucleotídica SEQ ID NO: 24.

La composición de aminoácidos teórica y la obtenida mediante HPLC con detección UV (luz ultravioleta) se presentan en la Tabla 6.

15 **Tabla 6.** Análisis de la composición de aminoácidos del biopolímero 4.

		Ala	Arg	Asp+Asn	Cys	Glu+Gln	Gly	Ile	Leu
Análisis amino-ácidos	Teórico	24	12	8+6	2	33+4	534	156	12
	Experimental	18,34	6,50	11,72	1,97	37,83	563,8	148,32	11,84
		Lys	Met	Phe	Pro	Ser	Thr	Tyr	Val
Análisis amino-ácidos	Teórico	12	1	2	257	23	6	2	341
	Experimental	9,75	1,39	1,16	283,18	12,65	3,83	2,67	350,61

El rendimiento de la producción fue de 239,81 mg/L.

El Peso Molecular teórico para el biopolímero 4 es de 123345 Da y se estimó experimentalmente por electroforesis en gel de poliacrilamida (**Fig. 13**) y por espectrometría de masas MALDI-TOF (**Fig. 14**) resultando ser de 122882 Da. Los espectros de IR y de RMN obtenidos para el biopolímero 4 quedan recogidos en las **Figs. 15 y 16**, respetivamente.

La Temperatura de transición obtenida mediante DSC en MQ a pH 6,48 fue de 17,58 °C, mientras que en PBS 1X a pH 6,02 fue de 14,92°C.

Biopolímero 5 (1455 aminoácidos)

Estructura: (A)-{(B₁₀-C₆₀)-Y}₂-D

Secuencia aminoacídica SEQ ID NO: 15: MESLLP-{{{(VPGVG)₂-(VPGEG)-(VPGVG)₂}}₁₀[VGIPG]₆₀}-[V(GAGAGS)₅G]₂}-([VPGIG]₅AVTGRGDSPASS)₆-V

5 Codificado por la secuencia nucleotídica SEQ ID NO: 25.

La composición de aminoácidos teórica y la obtenida mediante HPLC con detección UV (luz ultravioleta) se presentan en la Tabla 7.

10 **Tabla 7.** Análisis de la composición de aminoácidos del biopolímero 5.

		Ala	Arg	Asp	Glu	Gly	Ile
Análisis amino-ácidos	Teórico	52	6	6	21	574	150
	Experimental	50,94	4,31	5,39	29	581,86	149,41
		Leu	Met	Pro	Ser	Thr	Val
Análisis amino-ácidos	Teórico	2	1	257	39	6	341
	Experimental	0	1,37	255,77	31,08	4,33	335,86

El rendimiento de la producción fue de 203,07 mg/L.

15 El Peso Molecular teórico para el biopolímero 3 es de 120921 Da y se estimó experimentalmente por electroforesis en gel de poliacrilamida (**Fig. 17**) y por espectrometría de masas MALDI-TOF (**Fig. 18**) resultando ser de 120611 Da. Los espectros de IR y de RMN obtenidos para el biopolímero 2 quedan recogidos en las **Figs. 19 y 20**, respetivamente.

La Temperatura de transición obtenida mediante DSC en MQ a pH 6,59 fue de 20,84 °C, mientras que en PBS 1X a pH 7,24 fue de 17,26°C.

20

Biopolímero 6 (1508 aminoácidos)

Estructura: (A)-X-{(B₁₀-C₆₀)-Y}₂-D

Secuencia aminoacídica SEQ ID NO: 16: MESLLP-[VGGGGGKENQIAIRASFLEKENSALRQEVADLRKELGKCKNILAKYEAGGGGG]-

25 {{{(VPGVG)₂-(VPGEG)-(VPGVG)₂}}₁₀[VGIPG]₆₀}-[V(GAGAGS)₅G]₂}-

([VPGIG]₅AVTGRGDSPASS)₆-V

Codificado por la secuencia nucleotídica SEQ ID NO: 26.

La composición de aminoácidos teórica y la obtenida mediante HPLC con detección

UV (luz ultravioleta) se presentan en la Tabla 8.

Tabla 8. Análisis de la composición de aminoácidos del biopolímero 6.

		Ala	Arg	Asn+Asp	Cys	Glu+Gln	Gly	Ile	Leu
Análisis amino-ácidos	Teórico	58	9	3+7	1	27+2	585	153	7
	Experimental	53,78	7,72	11,15	0,32	38,85	583,93	147,01	8,90
		Lys	Met	Phe	Pro	Ser	Thr	Tyr	Val
Análisis amino-ácidos	Teórico	6	1	1	257	41	6	6	343
	Experimental	12,37	0,98	1,13	260,95	35,50	4,54	13,91	323,98

5 El rendimiento de la producción fue de 116 mg/L.

El Peso Molecular teórico para el biopolímero 6 es de 126393 Da y se estimó experimentalmente por electroforesis en gel de poliacrilamida (**Fig. 21**) y por espectrometría de masas MALDI-TOF (**Fig. 22**) resultando ser de 125857 Da. Los espectros de IR y de RMN obtenidos para el biopolímero 6 quedan recogidos en las

10 **Figs. 23 y 24**, respetivamente.

La Temperatura de transición obtenida mediante DSC en MQ a pH 7,50 fue de 20,42°C, mientras que en PBS 1X a pH 7,50 fue de 17,41°C.

15 **Ejemplo 2. Determinación de la composición de la biotinta de la invención que permite una impresión óptima.**

20 Las impresiones en 3D con los diferentes biopolímeros descritos en la Tabla 2, o con las mezclas de los mismos, se realizan teniendo en cuenta la temperatura de transición inversa de cada uno de ellos. Dicha temperatura de transición junto con las propiedades concretas de las composiciones de los biopolímeros de la invención, hace que las potenciales biotintas gelifiquen mediante un simple cambio en la temperatura.

25 El sistema experimental utilizado comprende una impresora REGEMAT 3D sobre la que se ha instalado un cabezal conectado a un baño refrigerante que permite mantener la temperatura de inyección a 4°C. Por otra parte, la impresora cuenta con una cama calefactora que se mantiene a 30°C durante el proceso de impresión.

En el caso del biopolímero 1 (SEQ ID NO: 11), la gelificación es debida a las fuerzas

intermoleculares hidrofóbicas presentes entre sus bloques C (hidrofóbico) y B (hidrofílico). El bloque D, que comprende específicamente el péptido RGD introducido a mayores en su secuencia no afecta a la formación del gel, sino que se introduce para aportar biofuncionalidad en el biopolímero. Este biopolímero 1 se utilizará como control negativo de la bioimpresión, dado que no contiene ninguno de los monómeros X, Y o ambos.

El resto de biopolímeros 2 (SEQ ID NO: 12), 3 (SEQ ID NO: 13), 4 (SEQ ID NO: 14), 5 (SEQ ID NO: 15) y 6 (SEQ ID NO: 16), que contienen los monómeros C (hidrofóbico) y B (hidrofílico) de base, además de los otros monómeros X y/o Y, también muestran estas interacciones hidrofóbicas. Todos ellos también contienen el bloque D que comprende, en los ejemplos mostrados, específicamente el péptido RGD para aportar biofuncionalidad al biopolímero, permitiendo que induzca adhesión celular.

Los biopolímeros 4 (SEQ ID NO: 14) y 3 (SEQ ID NO: 13) comprenden la secuencia *zipper* (SEQ ID NO: 4), que permite la formación de hélices alfa a través de la interacción de fuerzas electrostáticas entre aminoácidos cargados, contribuyendo a la estabilidad del polímero. Los biopolímeros 5 (SEQ ID NO: 15) y 2 (SEQ ID NO: 12) muestran las mismas interacciones hidrofóbicas, pero en este caso estabilizadas gracias a la formación de láminas beta procedentes de la secuencia silk (SEQ ID NO: 8), mediante la formación de puentes de hidrógeno entre los grupos amido y carboxilo presentes en sus aminoácidos.

Para el caso particular del biopolímero 5 (SEQ ID NO: 15) se ha llevado a cabo una comparación entre su gelificación cuando dicho biopolímero se ha sometido a un tratamiento de pre-curado (a partir de aquí se le denominará biopolímero 5 pre-curado) o cuando no ha sido sometido a dicho tratamiento (que se le seguirá llamando biopolímero 5). El tratamiento de pre-curado se realiza debido a la variabilidad que presenta el biopolímero 5 en cuanto a su estructura a nivel molecular pudiendo presentar distinto grado de formación de hojas beta que afectan a sus características mecánicas. Durante la producción y purificación del biopolímero 5, se produce la formación de láminas beta a través de enlaces de puente de hidrógeno. Dicho entrecruzamiento no es homogéneo entre los diferentes lotes del biopolímero, generando lotes de diferente entrecruzamiento inicial. Realizando la ruptura de los puentes de hidrógeno con el tratamiento de pre-curado, se asegura que el estado

inicial de formación de hojas beta es el mismo para todos los lotes. Para llevar a cabo el tratamiento del pre-curado, en primer lugar se procede a la homogenización del mismo realizando una ruptura de sus fuerzas intermoleculares mediante la utilización de ácido fórmico, que permite partir de un estado con ausencia de láminas beta. A partir de este estado, se somete el biopolímero a un curado a 37°C durante 24 horas favoreciendo la formación de láminas beta. De esta manera se asegura el mismo estado inicial en todos los lotes de este polímero y se parte de un estado pre-gelificado previsiblemente más adecuado para la impresión.

5
10 Tanto el biopolímero 1 (SEQ ID NO: 11) mezclado junto con el biopolímero 4 (SEQ ID NO: 14), así como el biopolímero 1 (SEQ ID NO: 11) mezclado con el biopolímero 5 pre-curado (SEQ ID NO: 15), sirven también como control negativo de la impresión. Su impresión demuestra que solamente en el caso de que la mezcla comprenda ambas secuencias de refuerzo se obtiene una óptima impresión (**Fig. 26**).

15
20 Por otro lado, con el objetivo de comprobar si las mezclas de los polímeros 4 y 5 pre-curado se comportan de la misma manera cuando los monómeros X e Y se localizan en el mismo biopolímero, se sintetizó el biopolímero 6 (SEQ ID NO: 6). Este biopolímero 6 posee tanto las interacciones hidrofóbicas iniciales como las interacciones electrostáticas y de puentes de hidrógeno procedentes de las secuencias *Zipper* y *Silk*.

Se llevaron a cabo diferentes impresiones con composiciones que comprenden los biopolímeros 1, 4, 5, 5 pre-curado y 6, solos o combinados. Para ello, mediante el software propio de la impresora REGEMAT 3D se diseña una gradilla de 10x10 mm, con una altura de 1,30 mm (correspondiente a 6 capas de altura), y porosidad de 1,5mm dispuesta en ángulo de 90°. Se inyectarán las diferentes composiciones de los biopolímeros de la invención con una tobera de 0,25 mm y 0,06 mm/s de flujo. El flujo se adecúa si es necesario en cada caso, para poder realizar líneas de anchura similares que permitan comparar mejor las estructuras entre sí.

30
35 Se estima que la concentración óptima de impresión del biopolímero 5 pre-curado disuelto en diferentes concentraciones de PBS 1x (120, 150, 180, 200, 250 y 300 mg/mL) es de 250 mg/mL, tal y como se observa en la **Fig. 25**, dado que dicha concentración es la concentración a la que la viscosidad de la disolución es adecuada

para el proceso de “inyección” mediante la impresora 3D. Por tanto, se selecciona la concentración de 250 mg/mL para la realización de la comparación de las diversas impresiones. Para el caso del biopolímero 4, tal y como se observa también en la **Fig. 25**, la concentración adecuada para el proceso de inyección en la impresora 3D es de 250 mg/mL.

La impresión de las gradillas diseñadas permite realizar una semi-cuantificación de la printabilidad de los diversos biopolímeros de la invención a través de la medida de la printabilidad, que nos da una idea de la semejanza que presenta la estructura impresa con respecto a la diseñada. En este caso se diseñan y se imprimen poros de forma cuadrada, por lo que se establece un parámetro (Pr) para medir la semejanza de las impresiones con respecto a estos cuadrados.

La biotinta que demuestre una buena printabilidad debe depositarse a través de la extrusión de filamentos de morfología constante que permitan su deposición en altura, sin fusionarse unos con otros. Si la biotinta demuestra menor printabilidad, esto no sucede y los filamentos tienden a colapsar y fusionarse, formando porosidades que tienden a ser circulares. Se define por tanto la circularidad como:

$$C = \frac{4\pi A}{L^2}$$

Donde L define el perímetro y A el área. Cuanto más cerca se encuentre el valor obtenido a 1, mayor será la circularidad, siendo 1 un círculo perfecto.

En el caso de formas cuadradas, la circularidad será $\pi/4$, y se puede definir el parámetro Pr basado en la forma cuadrada como:

$$Pr = \frac{\pi}{4} \cdot \frac{1}{C} = \frac{L^2}{16A}$$

Para una printabilidad ideal, los poros interconectados serán cuadrados y el valor de Pr será 1.

La determinación del parámetro Pr se realiza tomando fotografías con un microscopio digital LEICA DMS 1000 y las imágenes ópticas tomadas se analizan a través del software Image J (n=5) (**Fig 26**).

Los resultados de dicho parámetro para las muestras ensayadas se resumen en la **Tabla 9**.

- 5 **Tabla 9:** Medida de la printabilidad (Pr) obtenida en cada biotinta impresa a una concentración final de 250mg/mL.

BIOTINTAS (250 mg/mL)	VALOR Pr
biopolímero 1	-
biopolímero 4	0,94 ± 0,03
biopolímero 5	-
biopolímero 5 pre-curado	0,90 ± 0,09
biopolímero 6	0,97 ± 0,10
biopolímero 1 (40%) + biopolímero 4 (60%)	0,77 ± 0,04
biopolímero 1 (60%) + biopolímero 5 (40%)	0,73 ± 0,10
biopolímero 4 (60%) + biopolímero 5 (40%)	0,86 ± 0,04
biopolímero 4 (20%) + biopolímero 5 pre-curado (80%)	0,65 ± 0,32
biopolímero 4 (60%) + biopolímero 5 pre-curado (40%)	0,96 ± 0,04
biopolímero 4 (80%) - biopolímero 5 pre-curado (20%)	0,93 ± 0,02

- 10 Otro parámetro, cualitativo en este caso, para determinar la printabilidad de las biotintas es la observación fibrilar, es decir, si la deposición de los polímeros se deposita capa a capa y se observan las fibras depositadas, la estructura tenderá a colapsar menos que si estas fibras se funden entre sí, provocando menor fidelidad de forma.

15

En la **Fig. 26** se observan las fotografías de las impresiones realizadas. Tras la medición del parámetro Pr, se observa que a partir de un valor de Pr de 0,90, las impresiones se realizan de manera controlada, permitiendo la deposición de fibras que no se mezclan entre sí cuando se depositan, manteniendo su estructura fibrilar en altura.

20

Como se observa en la **Fig. 26**, el biopolímero 1 no gelifica tras su impresión, por lo

que no mantiene su estructura. Este comportamiento se corresponde con el esperado, dado que éste polímero no contiene los monómeros X y/o Y que permiten la estabilidad del gel que forma.

5 Al contrario que sucede en el biopolímero 1, cuando los biopolímeros presentan los monómeros X y/o Y, como en el caso de los biopolímeros 4, 5 y 5 pre-curado, se consiguen realizar impresiones con los mismos. El biopolímero 5 permite su impresión pero la estructura impresa se disgrega rápidamente de manera que no permite realizar la medición de su imprimibilidad. En cambio, el polímero 5 pre-curado muestra una
10 sobre-gelificación, que se observa en la deposición no lineal de las fibras, pese a que su fidelidad en la impresión es elevada. Por tanto, el hecho de que la muestra gelifique debido a un cambio de temperatura no es una condición suficiente como cabría esperar para conseguir una buena biotinta para este sistema y así obtener superficies impresas que muestren una estructura que realmente se asemeje a la diseñada. El
15 fenómeno que acompaña a la gelificación y las modificaciones en las propiedades mecánicas del material antes y después de la gelificación son determinantes y pueden ser inadecuadas sin poderse predecir cuál es el material adecuado como biotinta.

Por último el biopolímero 4 muestra estructuras fidedignas con valores de Pr de 0,94
20 **(FIG. 26)**.

Como el polímero 5 pre-curado muestra un parámetro más alto de imprimibilidad que el polímero 5, para demostrar el efecto sinérgico que los monómeros X e Y, se selecciona como portador del monómero Y el polímero 5 pre-curado, de manera que
25 se imprimen las mezclas: biopolímero 4 (80% en peso) + biopolímero 5 pre-curado (20% en peso); biopolímero 4 (60% en peso) + biopolímero 5 pre-curado (40% en peso) y biopolímero 4 (20% en peso) + biopolímero 5 pre-curado (80% en peso). La impresión de las proporciones del biopolímero 4 (60% en peso) + biopolímero 5 pre-curado (40% en peso) muestran el valor más alto de Pr obtenido en las mezclas
30 impresas, por lo que se puede considerar esta mezcla como óptima para impresión 3D. El valor más bajo se obtiene cuando la proporción del biopolímero 5 pre-curado es más elevada. Por otra parte, la impresión de la mezcla del biopolímero 4 (60% en peso) + biopolímero 5 (40% en peso), nos permite observar que cuando la mezcla en la impresión para este tipo de polímeros es óptima, si el biopolímero 5 no se encuentra
35 sometido a un pre-curado, la imprimibilidad disminuye, haciéndose necesaria la

utilización del biopolímero 5 pre-curado si se quiere obtener una mejor fidelidad en la estructura.

5 Para comprobar la sinergia entre los monómeros X e Y, se imprimen también las mezclas que comprenden el biopolímero 5 (40% en peso) + biopolímero 1 (60% en peso) y la mezcla del biopolímero 4 (60% en peso) + biopolímero 1 (40% en peso). Dichas mezclas muestran impresiones de peor imprimibilidad, comprobando que para la obtención de una buena imprimibilidad se hace necesaria la mezcla de los biopolímeros que comprenden los monómeros X e Y.

10

Por último, la impresión del biopolímero 6, muestra una muy buena fidelidad de forma en la que se observa la deposición de las fibras, de manera que no se acaban superponiendo del todo. Se obtiene para este polímero el valor más alto de imprimibilidad correspondiente a 0,97. Aunque el valor de Pr obtenido para este
15 polímero no dista mucho del de la mezcla que comprende el biopolímero 4 (60% en peso) + biopolímero 5 pre-curado (40% en peso), se observa en la impresión una mayor facilidad en su deposición, con un mejor control sobre las fibras depositadas.

Ejemplo 3. Propiedades mecánicas de las composiciones de la invención.

20

Se llevó a cabo un análisis reológico para analizar las propiedades mecánicas de las composiciones de la invención para su uso como biotintas. Se seleccionan aquellas composiciones que han demostrado tener una mayor printabilidad, correspondiéndose con las composiciones que comprenden el biopolímero 4, el biopolímeros 6, el
25 biopolímero 5 pre-curado y la mezcla de los biopolímeros 4 (60% en peso) + biopolímero 5 pre-curado (40% en peso).

El estudio reológico se lleva a cabo con un reómetro AR 200 EX de TA Instruments, equipado con una placa peltier, y una geometría de 40mm de diámetro. Todas las
30 composiciones analizadas se mantienen a 4°C durante los ensayos.

La primera caracterización se basa en el estudio de la variación de la viscosidad que presentan las composiciones de la invención para su uso como biotintas cuando se encuentran sometidas a una velocidad de corte creciente (**Fig 27**). Tanto el
35 biopolímero 4 como la mezcla que comprende el biopolímero 4 (60% en peso) + el

biopolímero 5 pre-curado (40% en peso), no muestran una disminución de su viscosidad cuando se produce un aumento en la velocidad de corte, por lo que se comportan como fluidos newtonianos que poseen viscosidades relativamente bajas (1 Pa.s, aproximadamente). El hecho de que se comporten como fluidos newtonianos de
5 bajas viscosidades, permite realizar deposiciones controladas con menores esfuerzos de corte, protegiendo así las células que se encuentren embebidas en dichas composiciones. Por otro lado, la composición formada por el biopolímero 5 pre-curado manifiesta una disminución de su viscosidad cuando se produce un aumento del esfuerzo de cizalla, partiendo de viscosidades de 10 Pa.s y llegando a estabilizarse en
10 viscosidades de 1 Pa.s cuando se somete la biotinta a velocidades elevadas de corte. Este comportamiento de la biotinta se asemeja con el que describe un fluido pseudoplástico.

Por otra parte, la composición que comprende el biopolímero 6 presenta un
15 comportamiento visco-plástico (o plástico Bingham), mostrando una viscosidad de 2,35 Pa.s hasta que alcanza un esfuerzo de deformación crítico correspondiente a 248,6 1/s, a partir del cual, comienza a disminuir ligeramente su viscosidad hasta llegar a 1,41 Pa.s.

20 Se puede concluir que las composiciones que comprenden el monómero Y muestran un comportamiento pseudoplástico en las biotintas. En el caso del biopolímero 6, este comportamiento sufre un retraso, se comienza a apreciar una vez que se sobrepasa un esfuerzo de deformación crítico. Dicho comportamiento se corresponde con un plástico de comportamiento visco-plástico o plástico Bingham.

25 Para simular el proceso de inyección al que se ven sometidas las composiciones de la invención cuando se usan como biotintas en una impresora, se llevó a cabo un análisis tixotrópico de las mismas. Este análisis consiste en someter los biopolímeros a una velocidad de corte elevada durante un corto período de tiempo, tratando de asemejar
30 las fuerzas a las que se ven sometidas las biotintas al atravesar una aguja de diámetro muy pequeño en el proceso de impresión.

Los resultados obtenidos en el análisis tixotrópico de las composiciones descritas anteriormente puso de manifiesto que no existe una variación en su viscosidad cuando
35 se simula el proceso de inyección, es decir, ninguna de las composiciones analizadas

varía su viscosidad al estar sometida durante un corto periodo de tiempo a un alto esfuerzo de cizalla (**Fig 28**).

5 Posteriormente se procedió al análisis de la variación de la viscosidad cuando se produce un aumento en la temperatura. El análisis determina cual es la temperatura idónea a la que se debe precalentar la base de impresión para lograr una mayor viscosidad en la biotinta y, por tanto, una mayor resolución en la impresión.

10 Los resultados demuestran que la viscosidad polimérica de las composiciones analizadas aumenta a medida que se incrementa la temperatura hasta alcanzar un valor máximo que depende de cada composición, y que varía de entre 18-22°C, y posteriormente dicha viscosidad disminuye paulatinamente a medida que se sigue incrementando la temperatura (**Fig. 29**). Esta viscosidad máxima alcanzada es diferente para cada composición de biotinta y dicho máximo se alcanza a distinta
15 temperatura. Así, tal y como se observa en la **Fig. 29**, la composición que comprende el biopolímero 4 presenta una viscosidad de 212,5 Pa.s a una temperatura de 15,0°C; la composición que comprende el biopolímero 5 pre-curado presenta una viscosidad de 90,9 Pa.s a la temperatura de 18,4°C, la composición que comprende el biopolímero 6 presenta una viscosidad de 371 Pa.s a la temperatura de 21,7°C y la
20 composición que comprende la mezcla de biopolímero 4 (60% en peso) + biopolímero 5 pre-curado (40% en peso) presenta una viscosidad de 242,6 Pa.s a la temperatura de 19,5°C.

Teniendo en cuenta dichos resultados, existe una correlación entre las viscosidades
25 máximas alcanzadas por las biotintas estudiadas y su printabilidad. Así, las biotintas que muestran menor printabilidad (las biotintas que comprenden los biopolímeros 4 y biopolímero 5 pre-curado, respectivamente) alcanzan una viscosidad máxima inferior que aquellas de mayor printabilidad (las biotintas que comprenden la mezcla biopolímero 4 (60% en peso) + biopolímero 5 pre-curado (40% en peso) y la biotinta
30 que comprende el biopolímero 6). Este hecho se explica teniendo en cuenta que cuanto mayor viscosidad demuestre poseer una biotinta, mayor será su fidelidad en la impresión.

Asimismo, se ha observado que en todas las biotintas existe un punto crítico de
35 temperatura a partir del cual la viscosidad comienza a aumentar paulatinamente, y

dicho punto crítico de temperatura se corresponde aproximadamente con los 8,5°C para las biotintas que comprenden el biopolímero 4 y la mezcla del biopolímero 4 (60% en peso) + biopolímero 5 pre-curado (40% en peso), y los 11°C para las biotintas que comprenden el biopolímero 5 pre-curado o el biopolímero 6. Este punto crítico indica que para poder imprimir con viscosidades bajas, las biotintas se deben mantener en el reservorio por debajo de esta temperatura.

EJEMPLO 4. Estabilidad en fluido de las biotintas.

A continuación se analizó la estabilidad de las composiciones descritas en la presente invención en un fluido seleccionado, que para el caso del presente ejemplo es PBS 1x. Dado que las estructuras impresas con las composiciones descritas en la presente invención servirán para cultivos *in vitro*, o para modelos tisulares, éstas deberán ser capaces de mantenerse estables en medios acuosos durante periodos de tiempo prolongados. Para este ejemplo se diseñan unos cilindros de 6mm de diámetro y 1,5 cm de altura, y las impresiones se llevaron a cabo a través de una tobera de 0,25 mm de diámetro. Las composiciones ensayadas han sido las composiciones que comprenden el biopolímero 4, biopolímero 5 pre-curado, biopolímero 6 o la mezcla del biopolímero 4 (60% en peso) + biopolímero 5 pre-curado (40% en peso).

La impresión con la composición que comprende el biopolímero 4 a una concentración de 250 mg/mL en PBS 1x, muestra un buen mantenimiento estructural, pero que no es capaz de mantenerse a lo largo del tiempo (**Fig. 30**). Por el contrario, las impresiones con las composiciones que comprenden el biopolímero 5 pre-curado, en las mismas condiciones que las mencionadas anteriormente, muestra una menor fidelidad de forma y un colapsamiento de la misma en un corto intervalo de tiempo, lo que no permite imprimir estructuras que en altura mantengan de manera adecuada la forma, pese a que con el tiempo sí que muestran estabilidad (**Fig. 31**).

Por el contrario, la impresión con la composición que comprende la mezcla del biopolímero 4 (60% en peso) + biopolímero 5 pre-curado (40% en peso), solventa los inconvenientes que dichas composiciones presentan por separado al ser utilizadas como biotintas. Esta mezcla permite realizar una impresión con buena fidelidad de forma y mantenimiento estructural a lo largo del tiempo, permitiendo la realización de estructuras complejas (**Fig. 32**). De igual manera, la biotinta que comprende la

composición con el biopolímero 6 también muestra un mantenimiento estructural a lo largo del tiempo, ya que comprende en su secuencia los monómeros X e Y (**Fig. 33**).

5 EJEMPLO 5. Evaluación de la viabilidad y citotoxicidad celular de las composiciones.

Una vez evaluada la printabilidad de las composiciones de la invención como biotintas y su consistencia a lo largo del tiempo, se procedió a evaluar su citotoxicidad y la viabilidad celular utilizando la línea celular de fibroblastos humanos HFF-1. Para ello se imprimen gradillas circulares porosas de 5mm de diámetro y 1mm de altura, con porosidad cuadrada de 1mm de lado.

La composición seleccionada para realizar los ensayos ha sido la composición que comprenden la mezcla del biopolímero 4 (60% en peso) + biopolímero 5 pre-curado (40% en peso), dado que, tal y como se ha demostrado en los ejemplos previos, son las composiciones que han demostrado la mejor printabilidad y estabilidad a lo largo del tiempo, ya que comprenden los monómeros X e Y. Para determinar la bioactividad que dicha composición posee al comprender en la secuencia de los biopolímeros que las comprenden el monómero D, específicamente el monómero D que comprenden la secuencia RGD, más específicamente el monómero D que comprende la secuencia SEQ ID NO: 6, se utiliza como control negativo una composición que comprende la mezcla del biopolímero 3 (60% en peso) + biopolímero 2 (40% en peso), donde dicha composición comprende la misma estructura que la otra composición ensayada, pero carece del monómero D, que permite la funcionalización y por lo tanto la bioactividad de las composiciones.

Sobre cada superficie impresa con cada una de las composiciones mencionadas previamente, se sembrarán 10.000 células. Se realiza un ensayo de Alamar blue para estudiar la viabilidad temprana y la proliferación celular. El Alamar Blue es un reactivo que contiene un indicador fluorescente que se reduce variando de color gracias a la actividad metabólica celular, permitiendo la determinación cuantitativa de la viabilidad y citotoxicidad celular. A través del ensayo de Alamar blue se observa la viabilidad celular temprana, a 30 minutos, 2 horas y 4 horas de la siembra con cada una de las composiciones ensayadas. Mediante una recta de calibrado se calcula el número de

células adheridas sobre las superficies y se pone de manifiesto que el número de células que se adhieren es significativamente superior en aquellas gradillas que han sido impresas con la composición que comprende la mezcla del biopolímero 4 (60% en peso) + biopolímero 5 pre-curado (40% en peso) que comprende el monómero D, con respecto a la composición que comprende la mezcla del biopolímero 3 (60% en peso) + biopolímero 2 (40% en peso) que no comprende el monómero D (**Fig. 34**). Por tanto, se deduce que la presencia de la secuencia de adhesión de integrinas RGD en las biotintas permite y mejora la adhesión celular temprana.

Por otra parte, también se analiza la proliferación celular de fibroblastos sobre las gradillas impresas con las composiciones mencionadas previamente, durante largos periodos de tiempo, 21 días. Los resultados muestran un aumento paulatino del porcentaje de reducción de AlamarBlue en ambas composiciones a lo largo del tiempo, partiendo de un porcentaje del 4,4% en el inicio hasta el 64,1% en el caso de la composición que comprende la mezcla de los biopolímeros 4 (60% en peso) + biopolímeros 5 pre-curado (40% en peso), y de un 2,2% en el inicio hasta un 53,2% en el caso de la composición que comprende la mezcla de los biopolímeros 3 + (60% en peso) + biopolímero 2 (40% en peso) (**Fig. 35**). Dicho porcentaje es significativamente superior en el caso de las gradillas que han sido impresas con la composición que comprende la mezcla con el monómero D en su secuencia.

Para demostrar que las células se han adherido a las gradillas impresas con las composiciones mencionadas anteriormente, se llevó a cabo una tinción DAPI/Phalloidina. La tinción DAPI (azul) se utiliza para teñir los enlaces adenina-timina del DNA presente en el núcleo celular, mientras que la Phalloidina (verde) se utiliza para teñir los filamentos de actina, permitiendo la observación del resto del citoplasma. La combinación de ambas tinciones permite la observación de la morfología celular.

Se realiza la tinción de DAPI/Phalloidina a los 14 días del cultivo de los fibroblastos con las gradillas impresas con la composición que comprende el biopolímero 4 (60% en peso) + biopolímero 5 pre-curado (40% en peso). En la **Fig. 36** se observa cómo las células se han adherido a las gradillas impresas, situándose preferentemente de manera longitudinal, llegando a formar una matriz tridimensional. También se observan las células dispuestas en diferentes alturas correspondientes a la deposición de las diferentes fibras (**Fig. 37**), demostrando que la morfología o estructura de la gradilla

condiciona la disposición y el crecimiento celular.

Por lo tanto, tal y como se muestran en los ejemplos incluidos en el presente documento, las composiciones que comprenden la mezcla del biopolímero 4 + el
5 biopolímero 5 pre-curado, así como las composiciones que comprenden el biopolímero 6, pueden ser utilizadas como biotintas. Dichas composiciones poseen una buena printabilidad, permitiendo la impresión de estructuras resolutiveas en altura y estables en el tiempo (**Tabla 9, Fig. 30 y 31**), específicamente gracias a la presencia en sus secuencias de los monómeros X y/o Y. Además, poseen bajas viscosidades que
10 facilitan la impresión a bajas temperaturas (**Fig. 27**), y un rápido aumento de viscosidad cuando aumenta la temperatura (**Fig. 29**), hecho que facilita que la estructura impresa se mantenga estable en el proceso de impresión. Y adicionalmente, gracias a la presencia del monómero D permiten la adhesión y proliferación celular.

15

REIVINDICACIONES

1. Composición que comprende un biopolímero que comprende los monómeros B, C y al menos el monómero X, Y o ambos, donde
 - 5 B es una secuencia aminoacídica que comprende la SEQ ID NO: 2,
 - C es una secuencia aminoacídica que comprende la SEQ ID NO: 3,
 - X es una secuencia aminoacídica que comprende la SEQ ID NO: 4, e
 - Y es una secuencia aminoacídica que comprende la SEQ ID NO: 5.

- 10 2. Composición según la reivindicación 1, donde además el biopolímero comprende el monómero D, siendo dicho monómero D una secuencia aminoacídica de unión celular.

3. Composición según la reivindicación 2 donde el monómero D comprende una
 - 15 secuencia que se selecciona de una lista que consiste en: RGD (SEQ ID NO: 9), LDT (SEQ ID NO: 27), SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 17, SEQ ID NO: 18, SEQ ID NO: 19, SEQ ID NO: 28 o SEQ ID NO: 29.

4. Composición según cualquiera de las reivindicaciones 2 a 3 donde el monómero D
 - 20 comprende la SEQ ID NO: 6.

5. Composición según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4 donde el biopolímero tiene la estructura (I):

$$25 \quad [(B_b-C_c)-Z_z]_n-D_d$$
 - donde B, C y D se definen en las reivindicaciones 1 a 4,
 - Z se selecciona entre los monómeros X e Y definidos en la reivindicación 1,
 - b tiene valores de entre 5 y 15,
 - c tiene valores de entre 50 y 70;
 - 30 z tiene valores de entre 1 y 5
 - n tiene valores de entre 1 y 5, y
 - d tiene valores de entre 0 y 3.

6. Composición según la reivindicación 5 donde Z es la SEQ ID NO: 4.

- 35 7. Composición según la reivindicación 5 donde Z es la SEQ ID NO: 5.

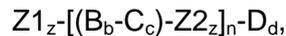
8. Composición según cualquiera de las reivindicaciones 5 a 7, caracterizada por que comprende un primer biopolímero de estructura (I), donde Z es la SEQ ID NO: 4 y un segundo biopolímero de estructura (I), donde Z es la SEQ ID NO: 5.

5

9. Composición según la reivindicación 8 donde el primer biopolímero se encuentra en la composición en una concentración de entre 40-60% en peso y el segundo biopolímero se encuentra en la composición a una concentración de entre 60-40% en peso.

10

10. Composición según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, donde el biopolímero tiene la estructura (II):



15

donde B, C y D se definen en las reivindicaciones 1 a 4,

Z1 es una secuencia aminoacídica que comprende la SEQ ID NO: 4 o SEQ ID NO: 5 y Z2 es una secuencia aminoacídica que comprende la SEQ ID NO: 5 o SEQ ID NO: 4, respectivamente; preferiblemente Z1 es la secuencia aminoacídica SEQ ID NO: 4 y Z2 es la secuencia aminoacídica SEQ ID NO: 5;

20

b, c, z, n y d se definen en la reivindicación 5.

11. Composición según cualquiera de las reivindicaciones 5 a 10, donde b tiene un valor de 10, c tiene un valor de 60, z tiene un valor de 1, n tiene un valor de 2 y d tiene un valor de 0 o 1.

25

12. Composición según la reivindicación 2 donde el biopolímero se selecciona de la lista que consiste en: SEQ ID NO: 12, SEQ ID NO: 13, SEQ ID NO: 14, SEQ ID NO: 15 and SEQ ID NO: 16.

30

13. Composición, según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 12, que comprende además células, moléculas bioactivas, principios activos, o combinaciones de los mismos.

35

14. Composición según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 13 caracterizada por que se encuentra en forma de hidrogel.

15. Ácido nucleico que comprende una secuencia nucleotídica que codifica para la secuencia aminoacídica del biopolímero de la composición según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 14.
- 5 16. Célula aislada transfectada con el ácido nucleico según la reivindicación 15.
17. Uso de la composición según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 14 como biotinta, preferiblemente para la impresión 2D o 3D de biomateriales.
- 10 18. Uso de la composición según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 14, del ácido nucleico según la reivindicación 15, o de la célula según la reivindicación 16, para la preparación de un soporte para obtención de órganos y/o tejidos o para la encapsulación de principios activos o células.
- 15 19. Biotinta que comprende la composición según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 14.
20. Biomaterial 3D o 2D que comprende la composición según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 14.
- 20 21. Composición según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 14 para su uso como medicamento.
22. Composición según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 14 para su uso en
- 25 regeneración tisular.
23. Método para la obtención de la composición según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 14 que comprende las siguientes etapas:
- 30 (a) cultivar la célula según la reivindicación 16 en las condiciones adecuadas para la expresión del ácido nucleico según la reivindicación 15,
- (b) purificar el biopolímero codificado por dicho ácido nucleico.

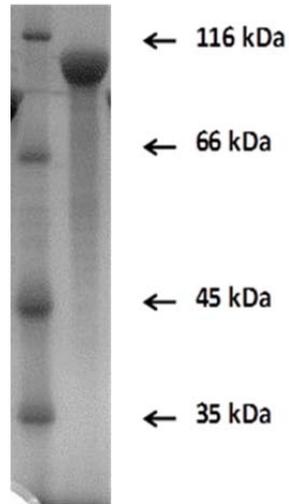


Fig. 1

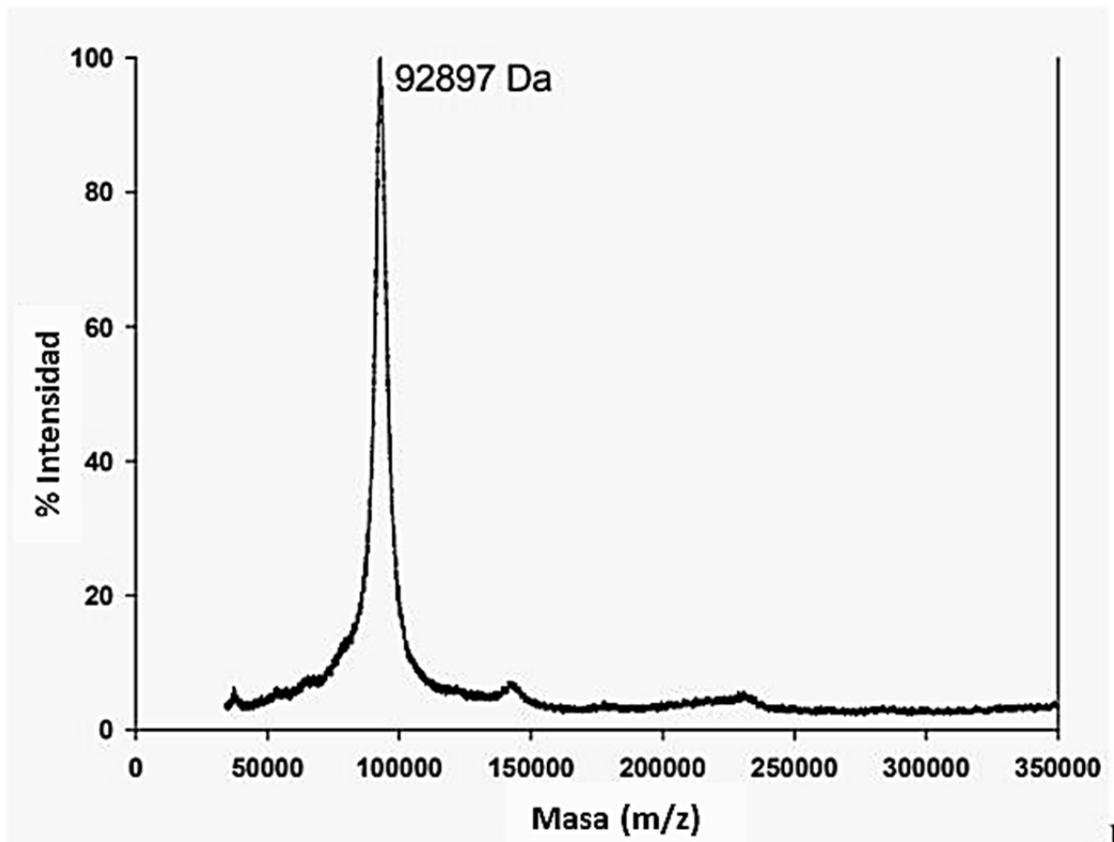


Fig. 2

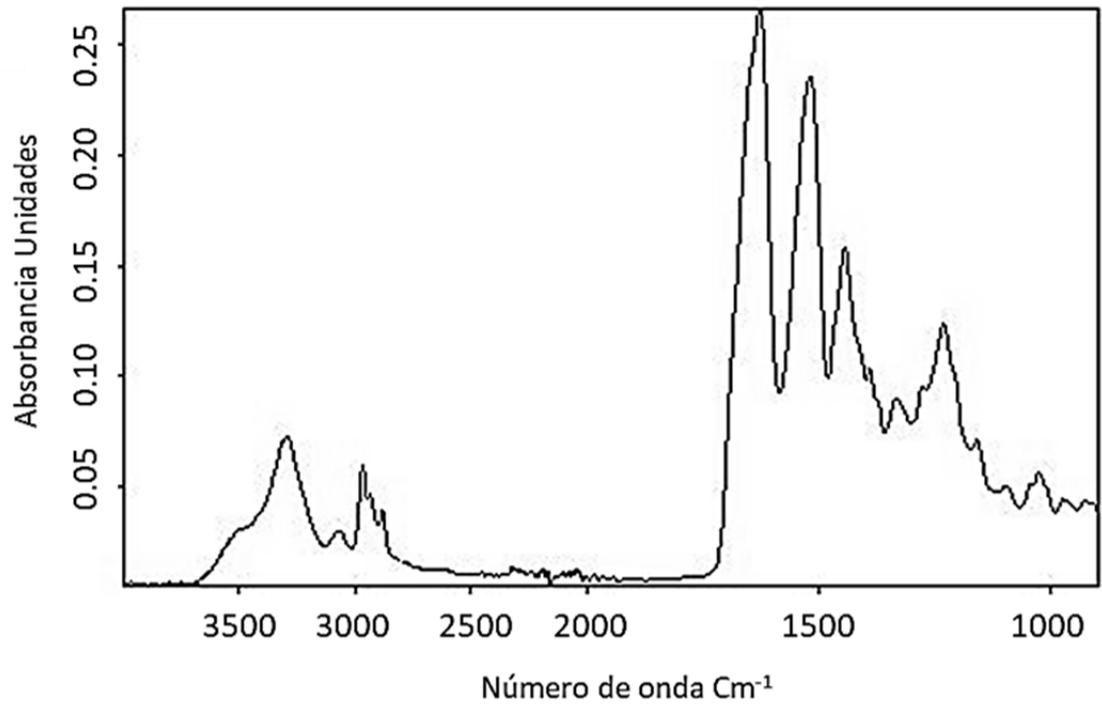


Fig. 3

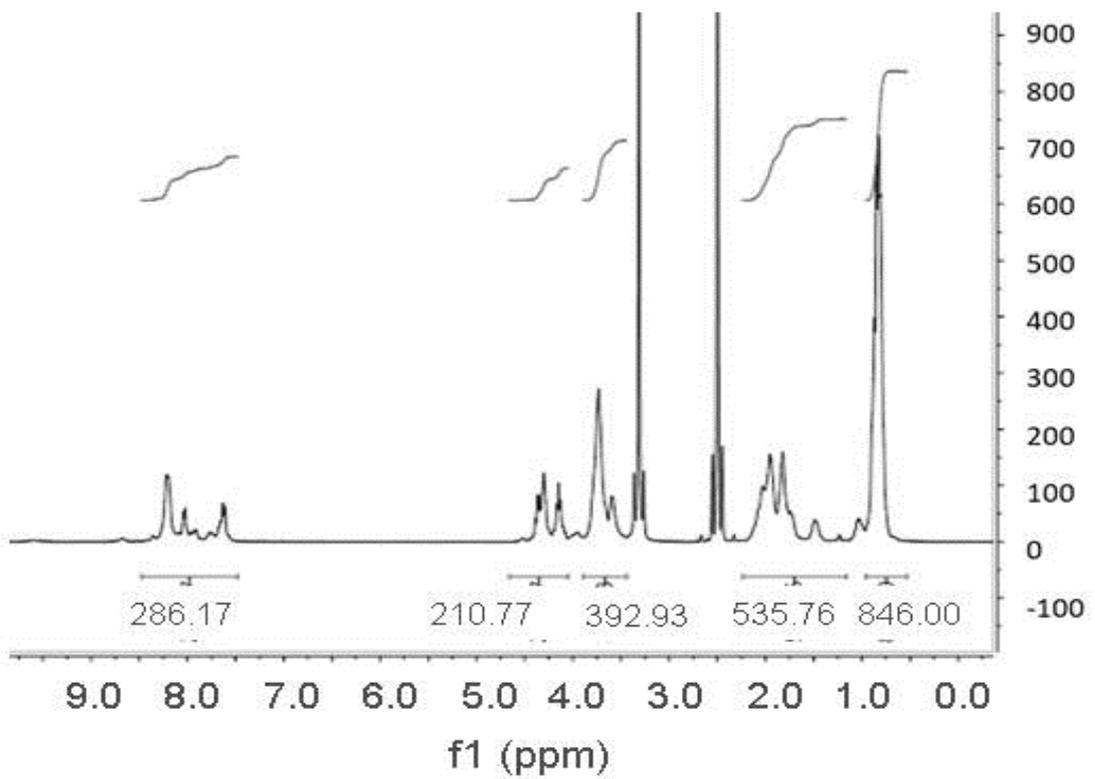


Fig. 4

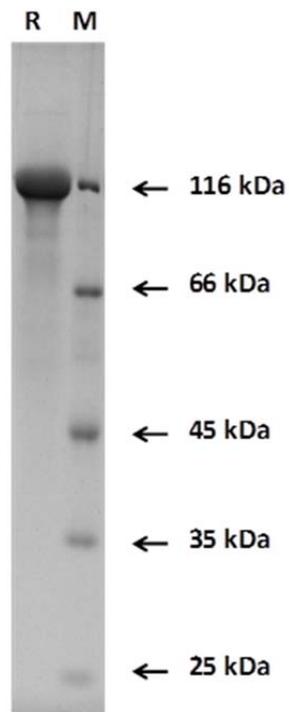


Fig. 5

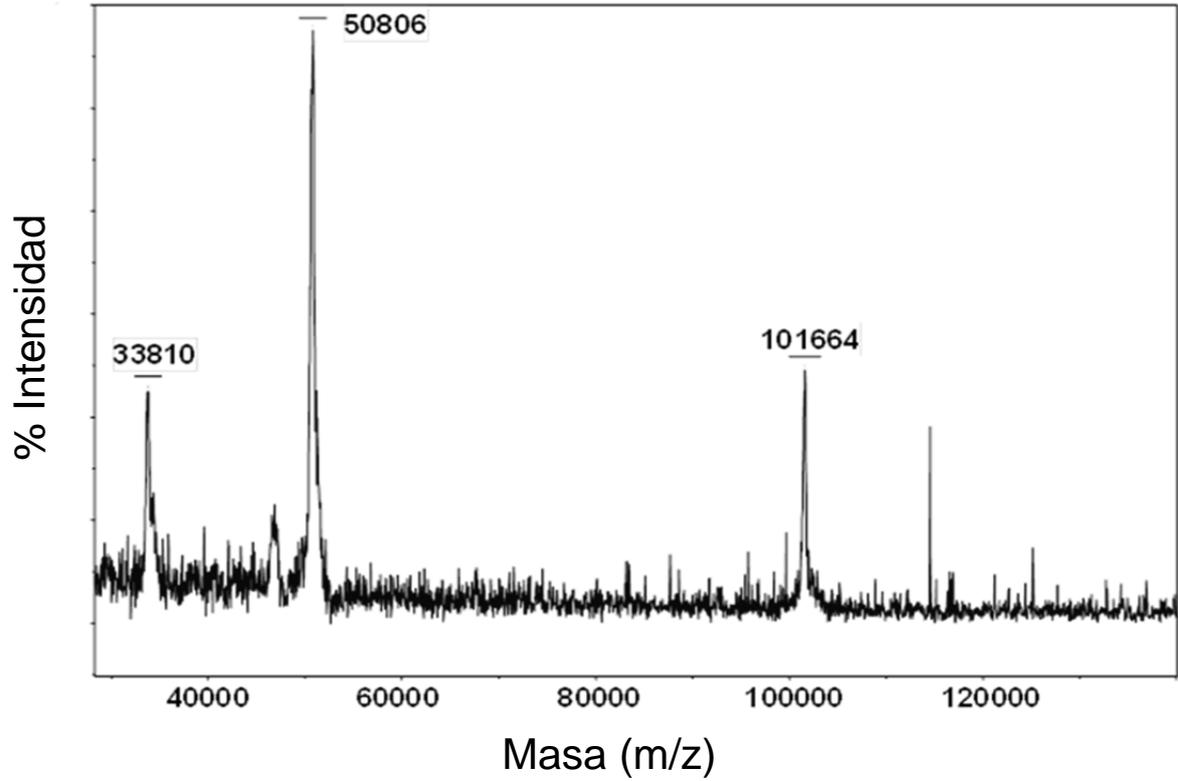


Fig. 6

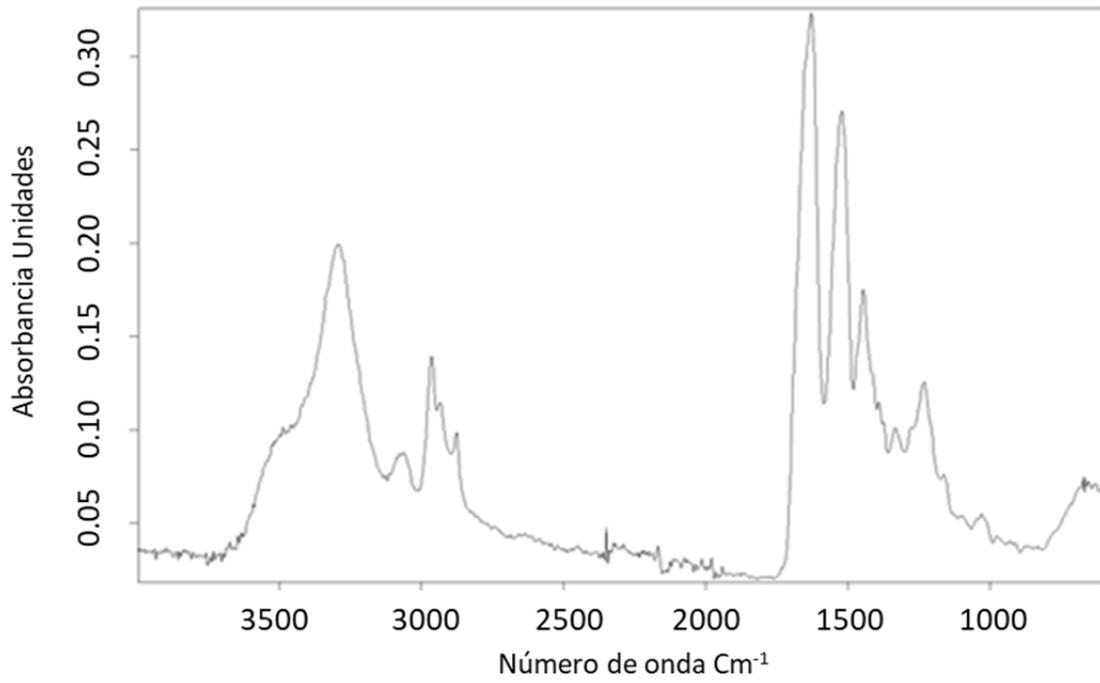


Fig. 7

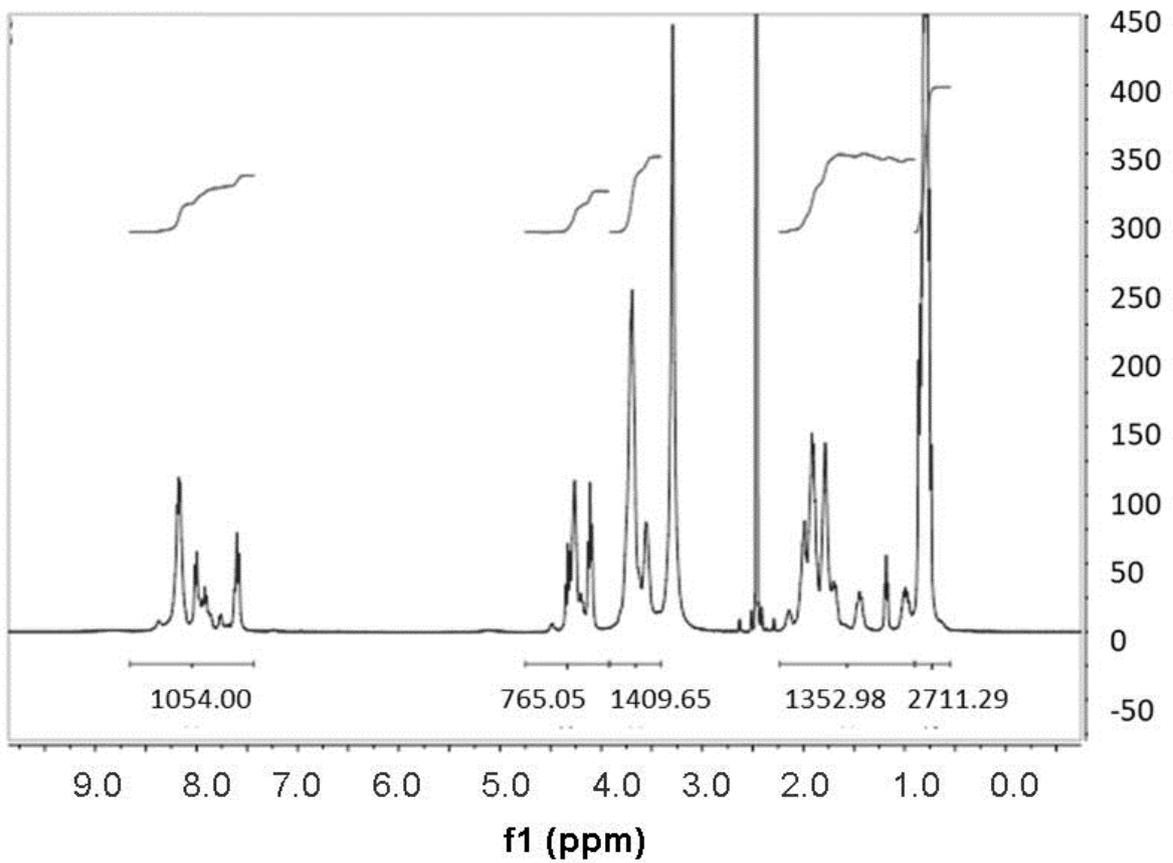


Fig. 8

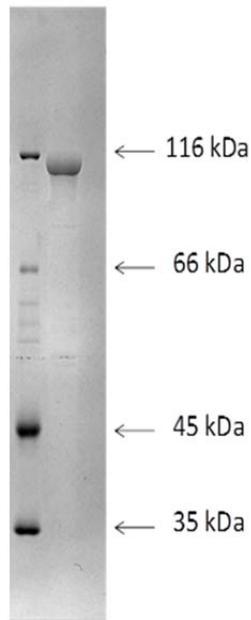


Fig. 9

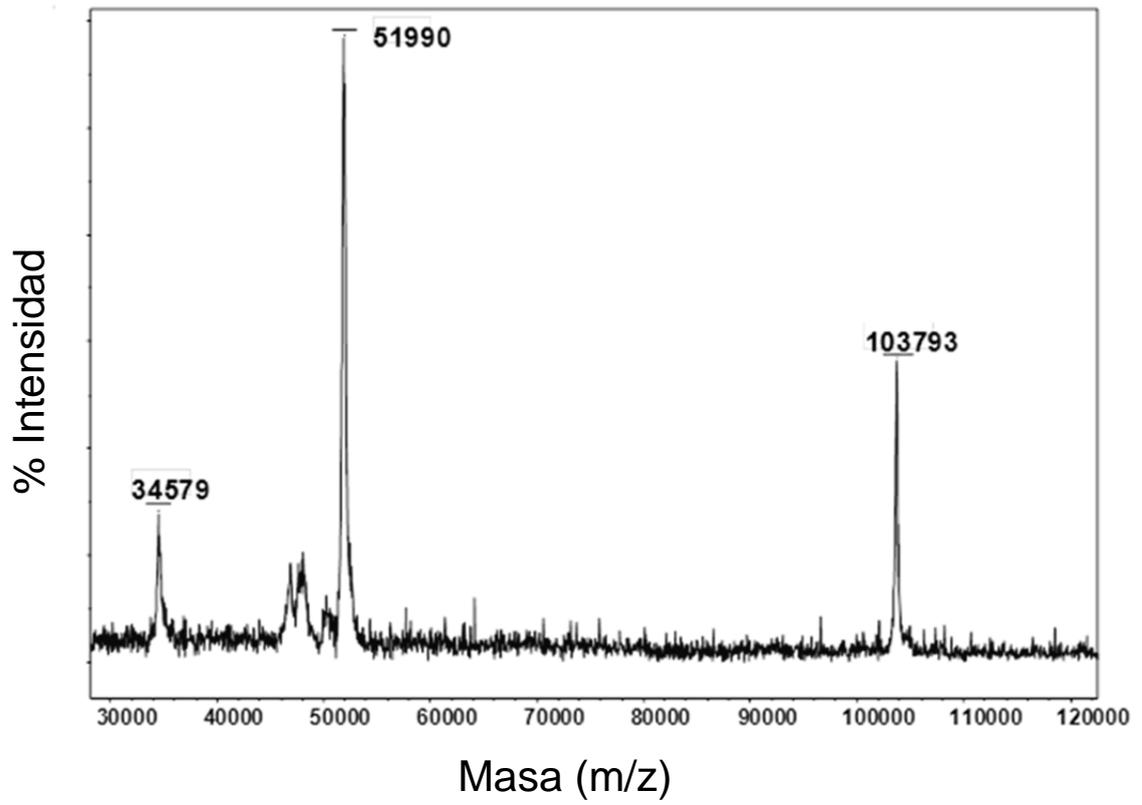


Fig. 10

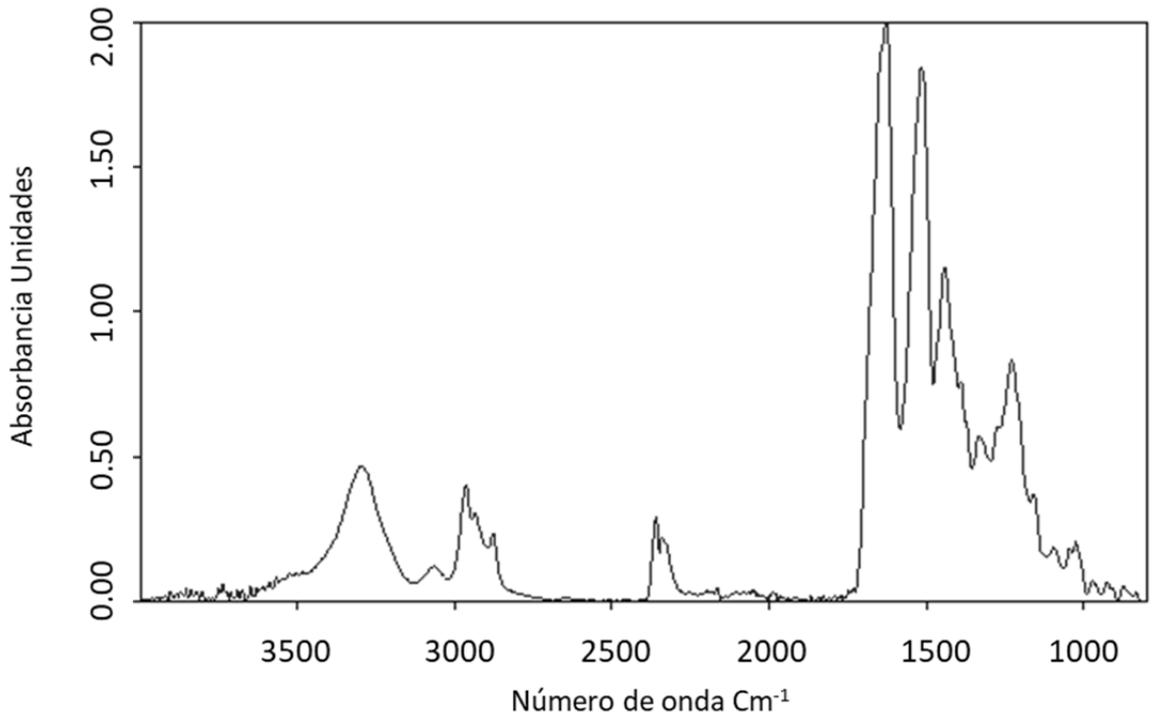


Fig. 11

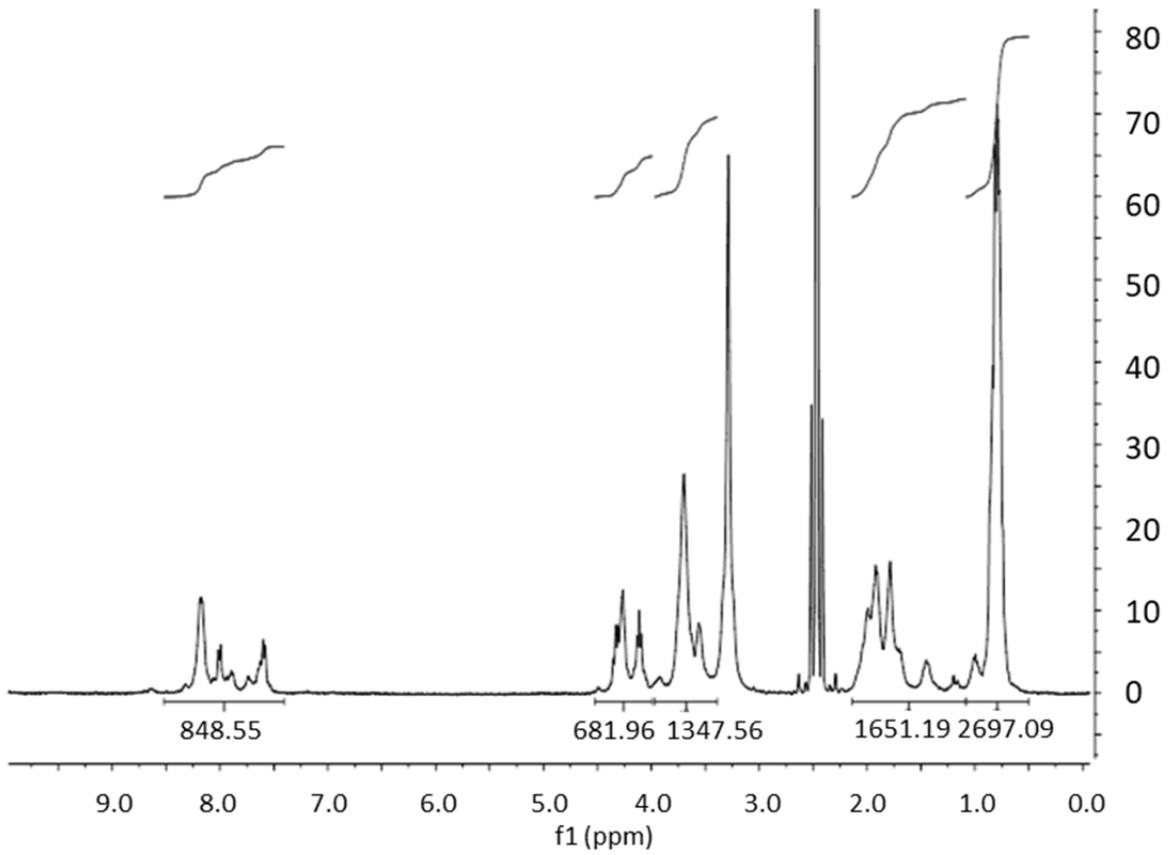


Fig. 12

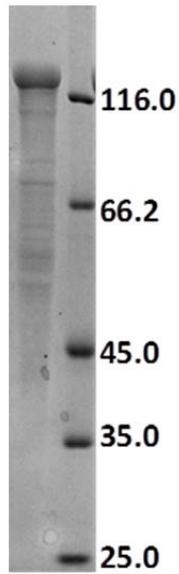


Fig. 13

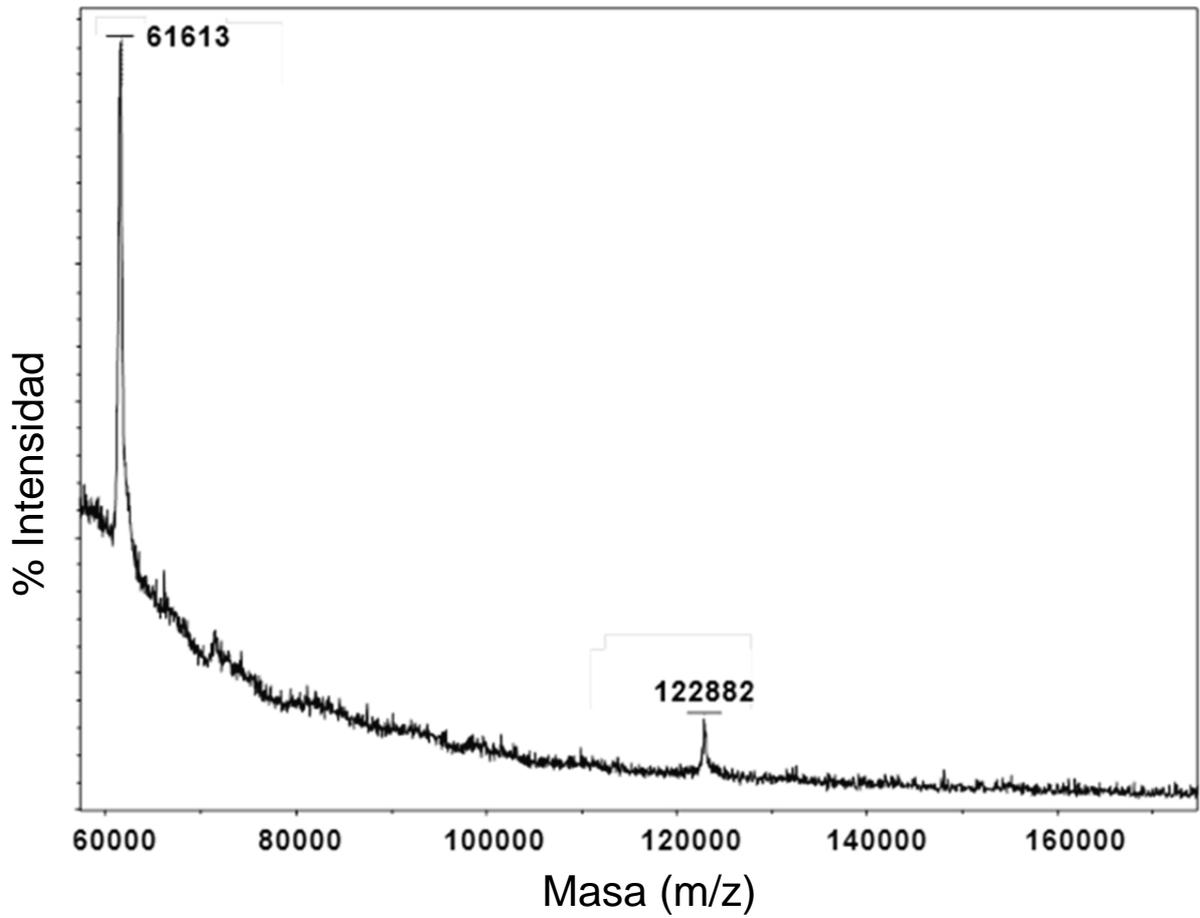


Fig. 14

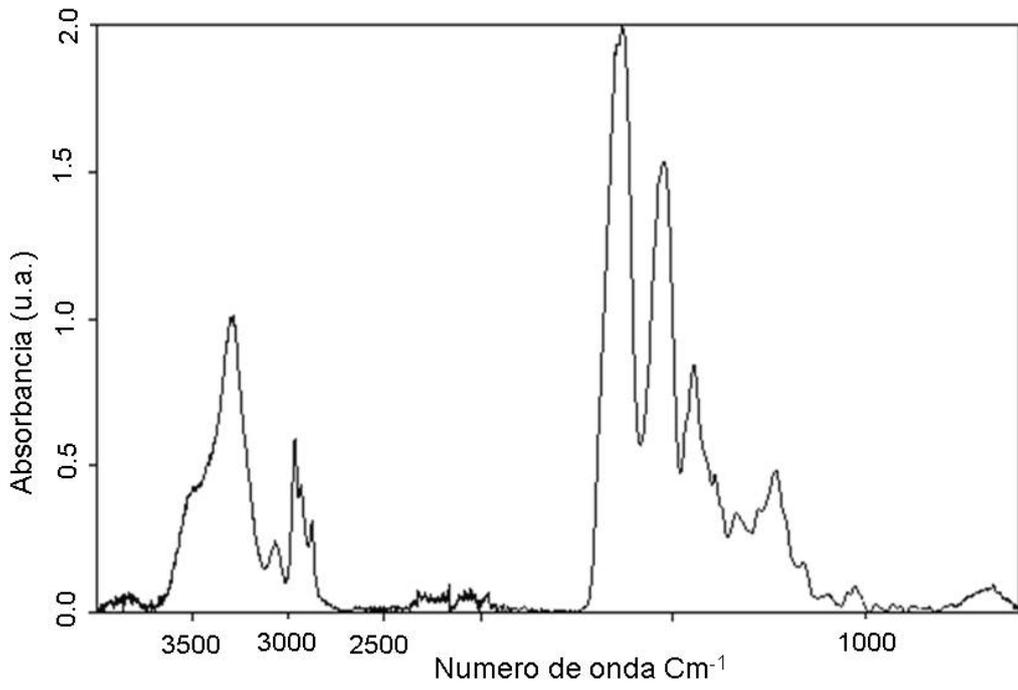


Fig. 15

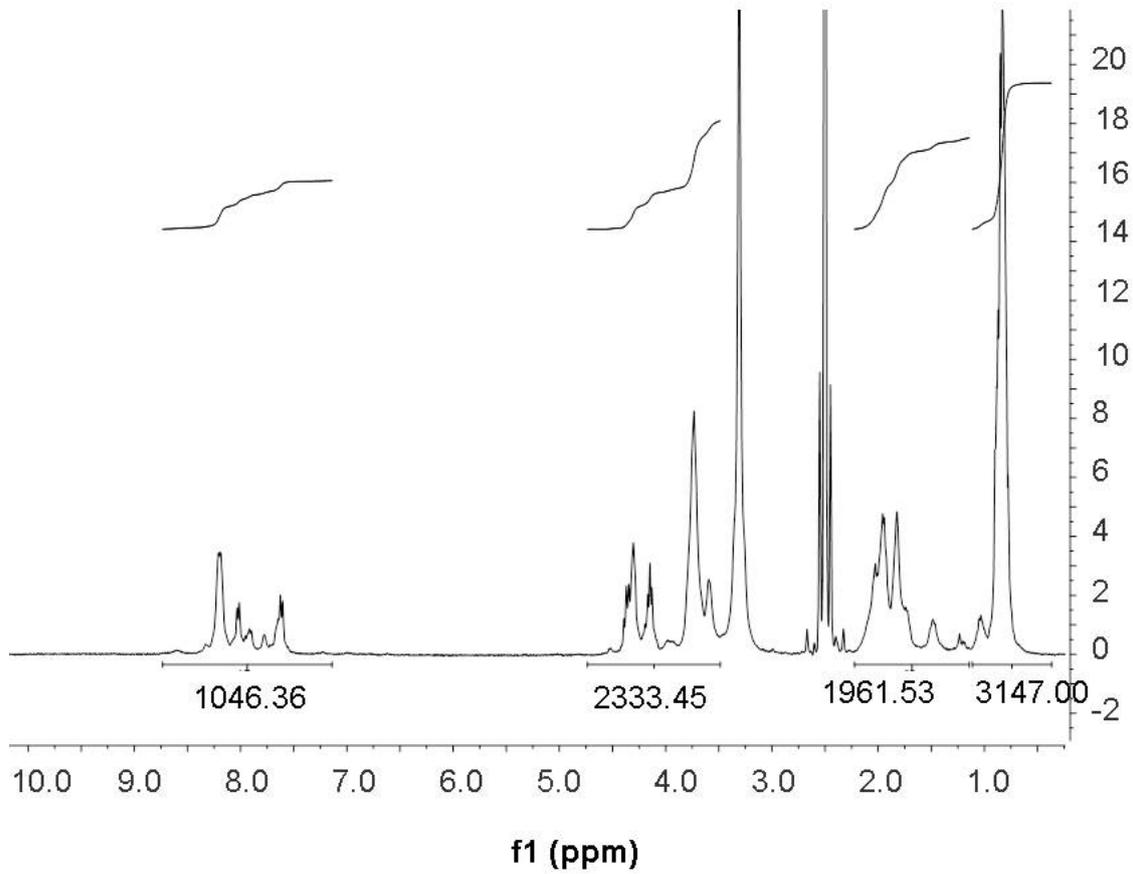


Fig. 16

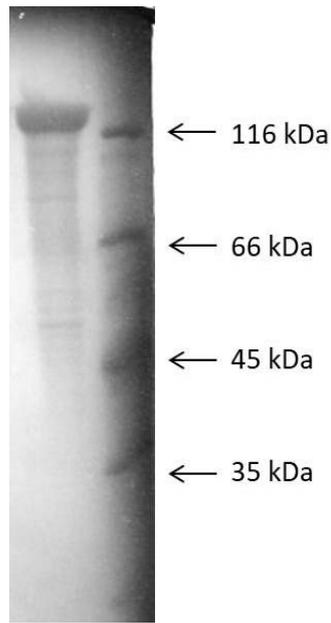


Fig. 17

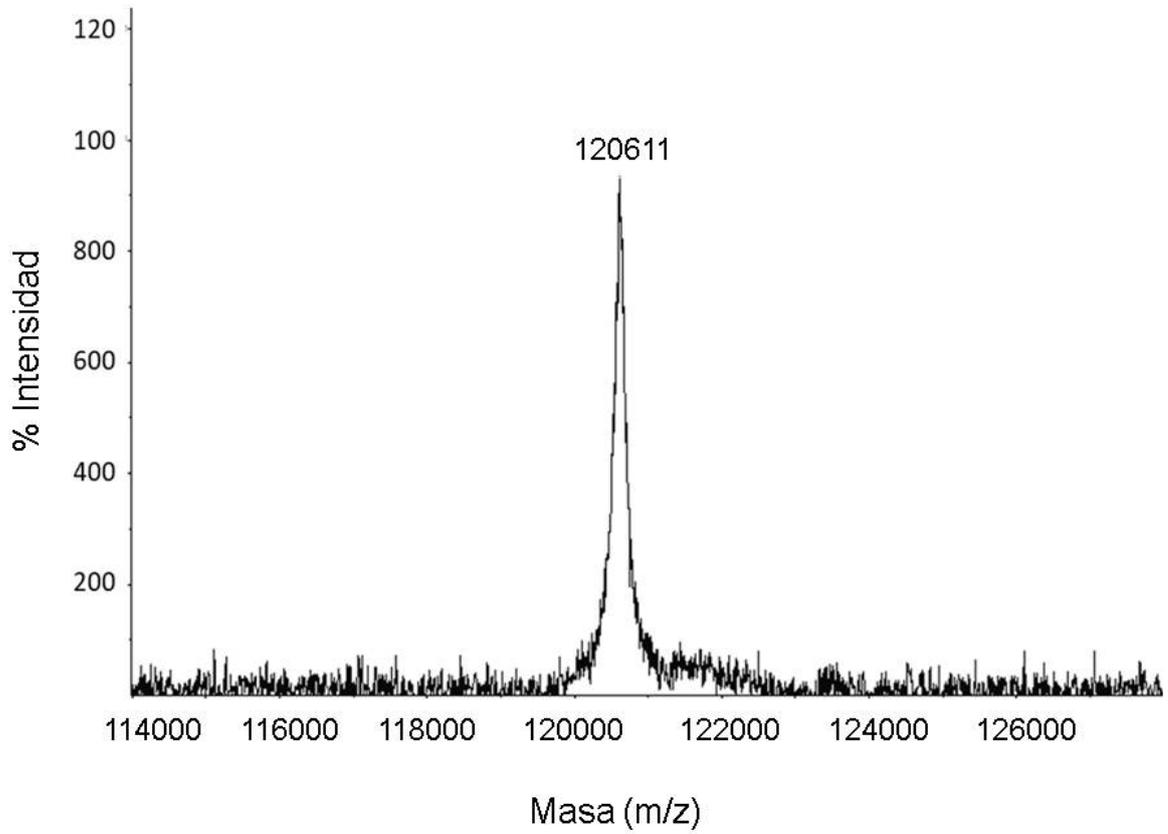


Fig. 18

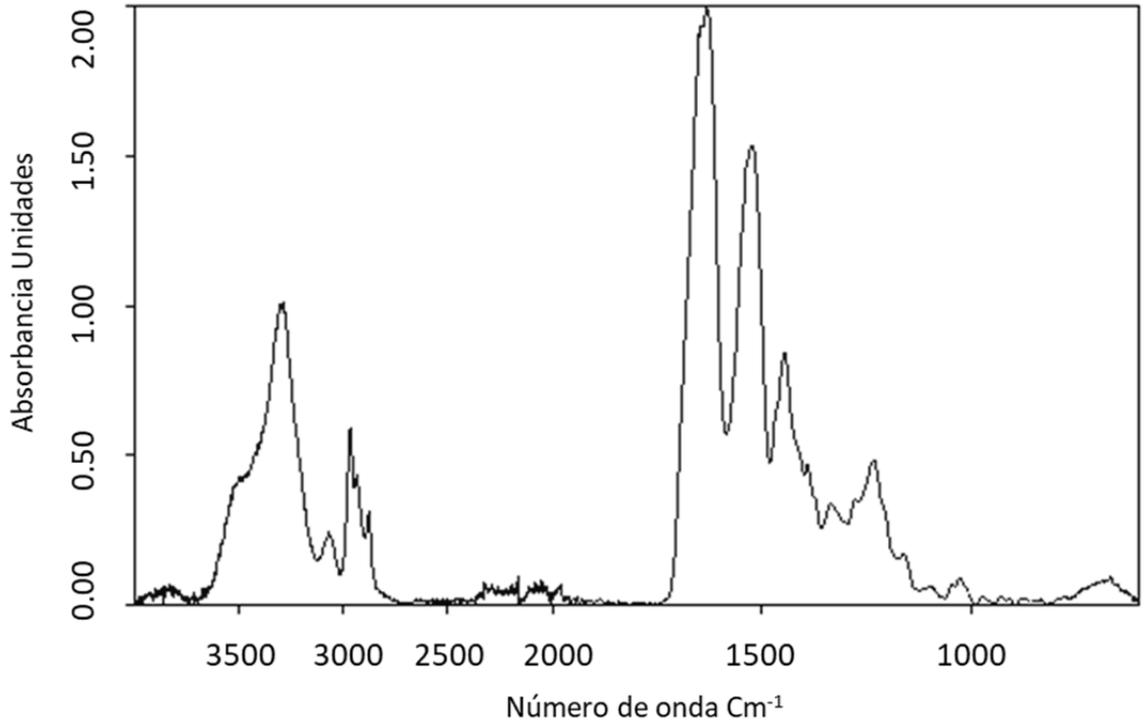


Fig. 19

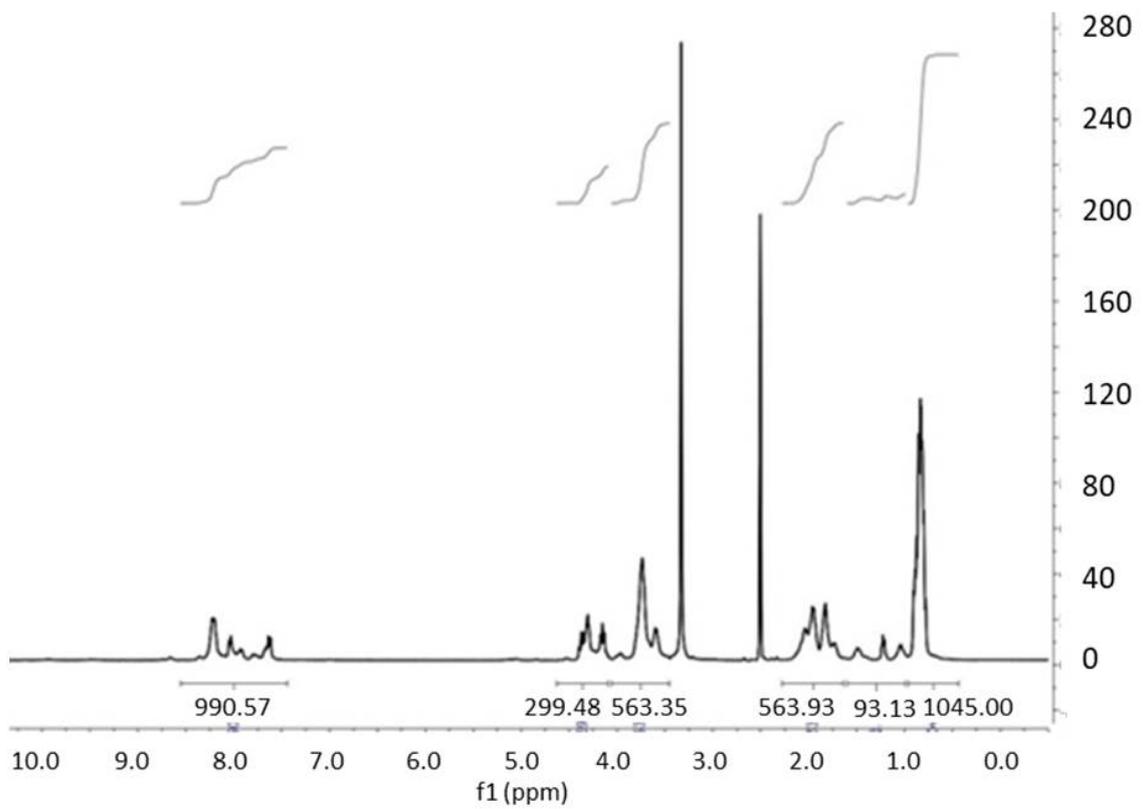


Fig. 20

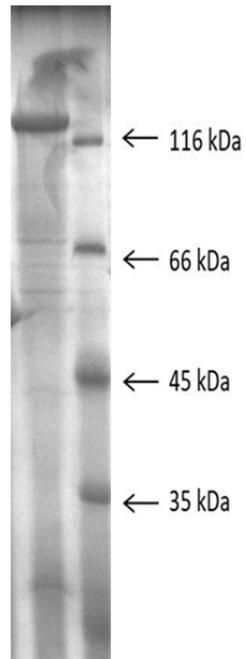


Fig. 21

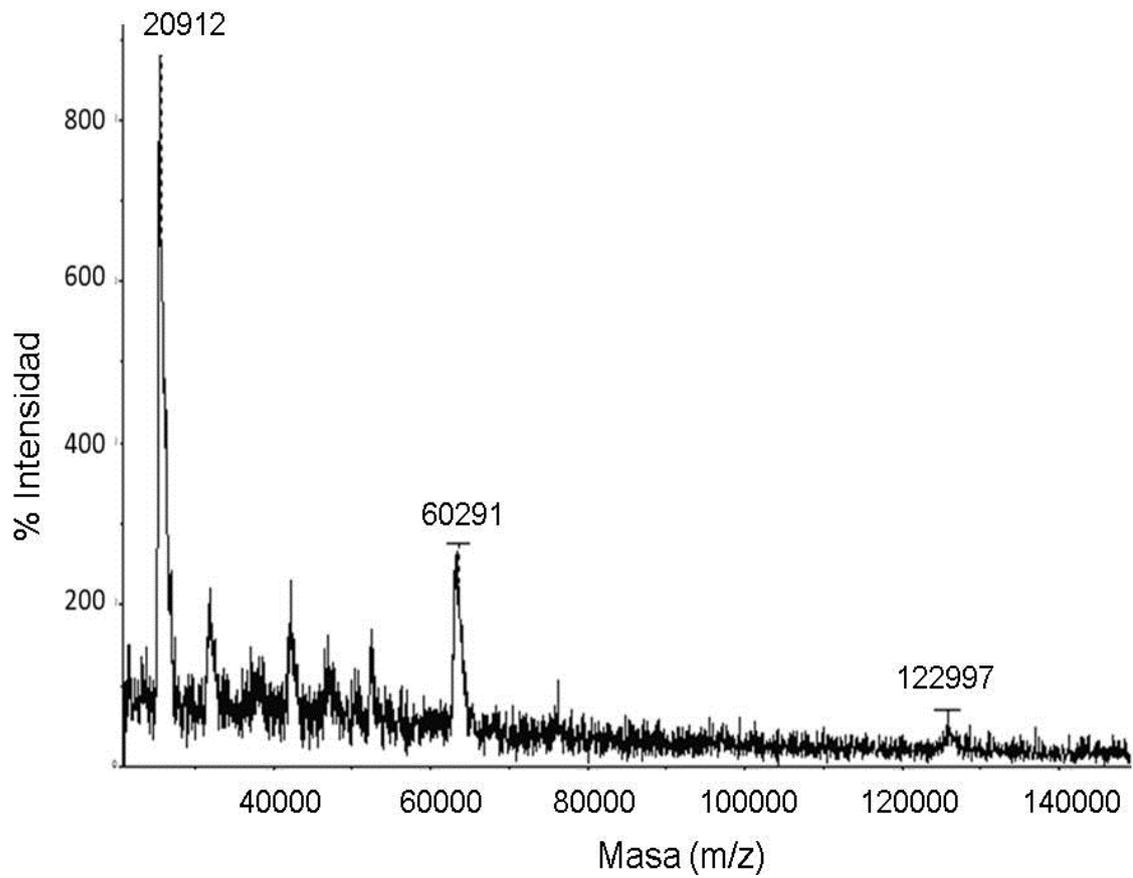


Fig. 22

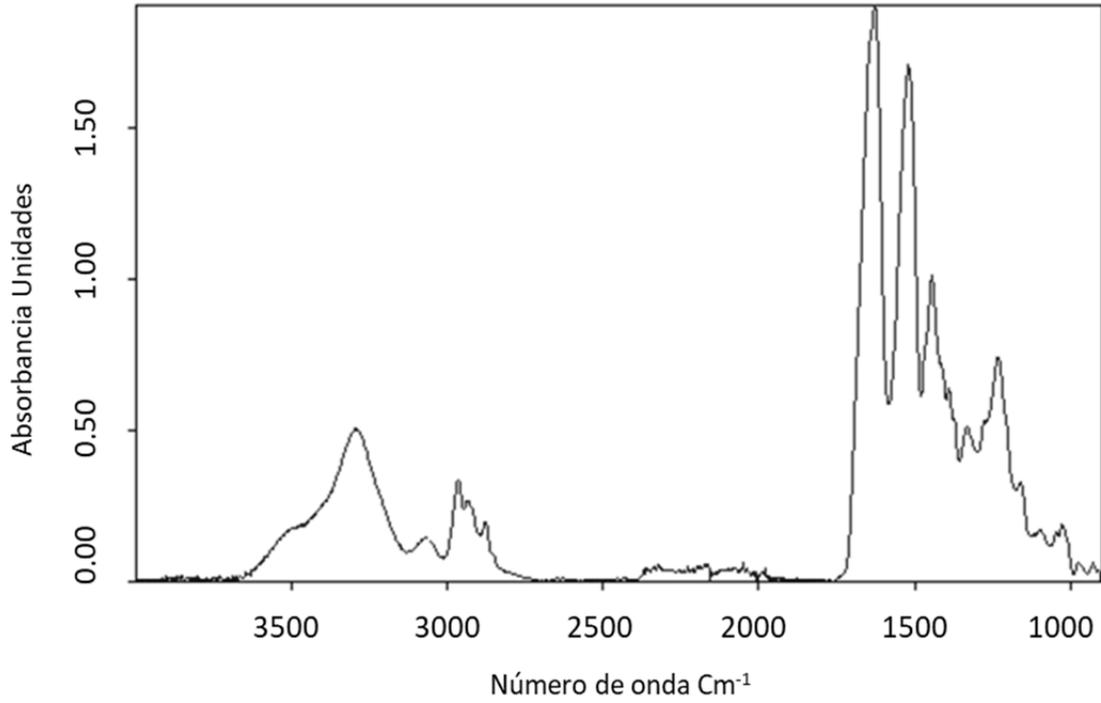


Fig. 23

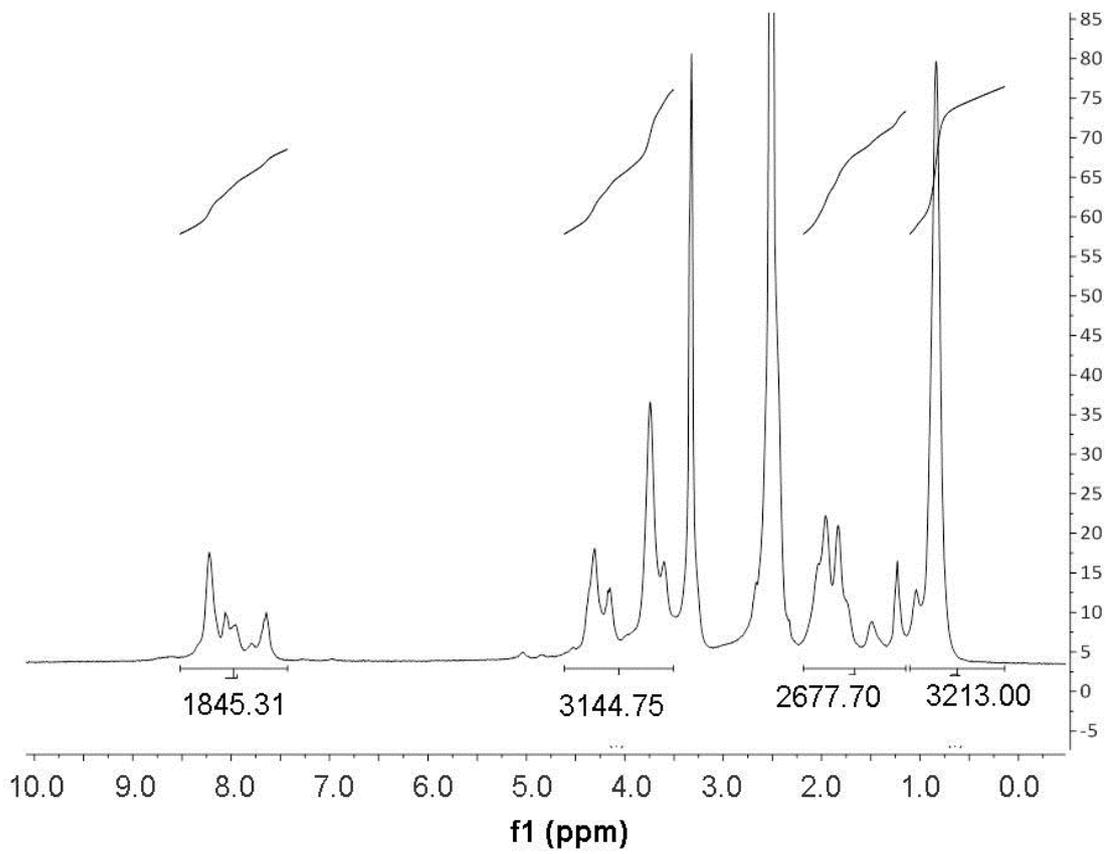


Fig. 24

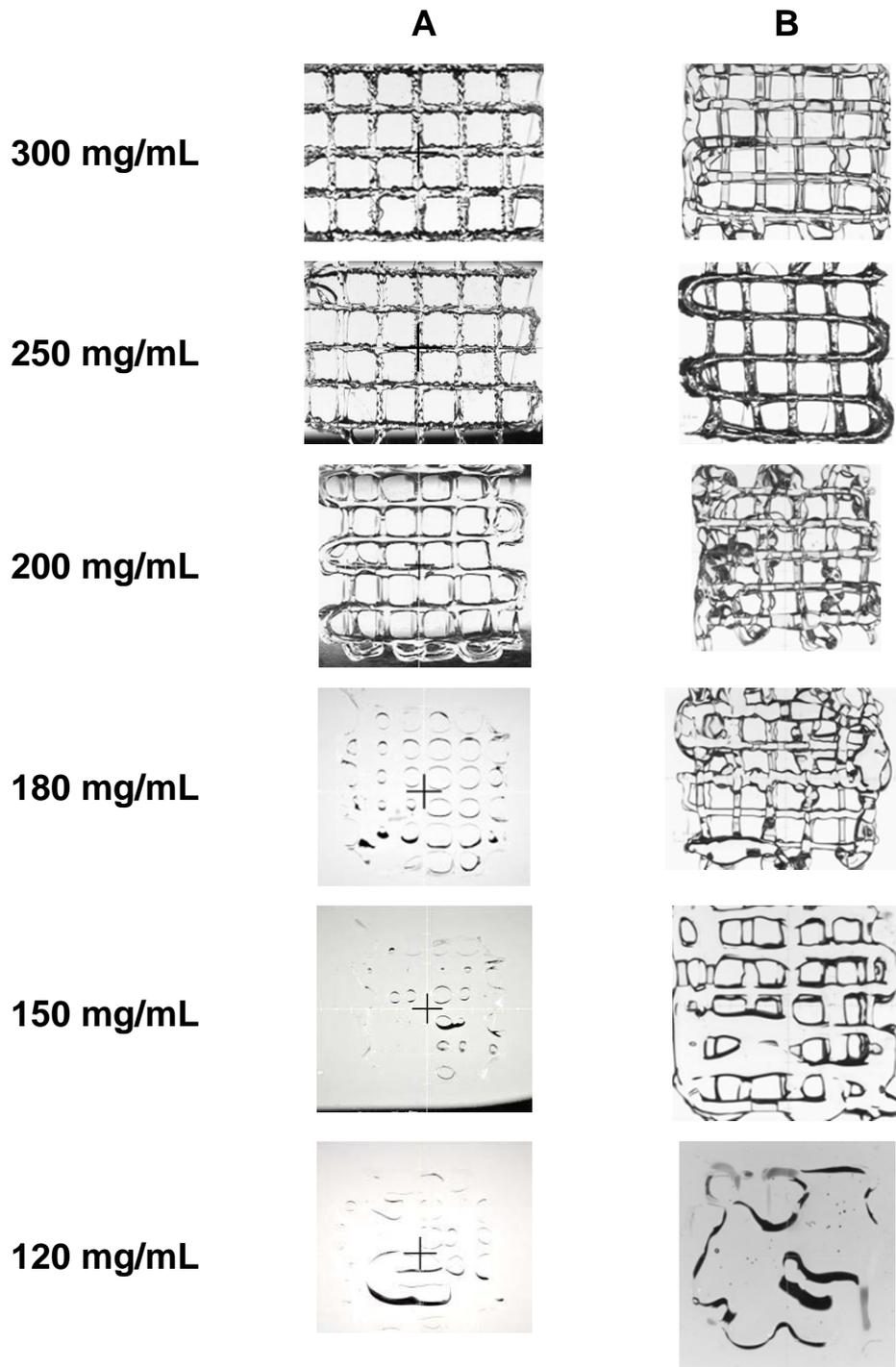


Fig. 25

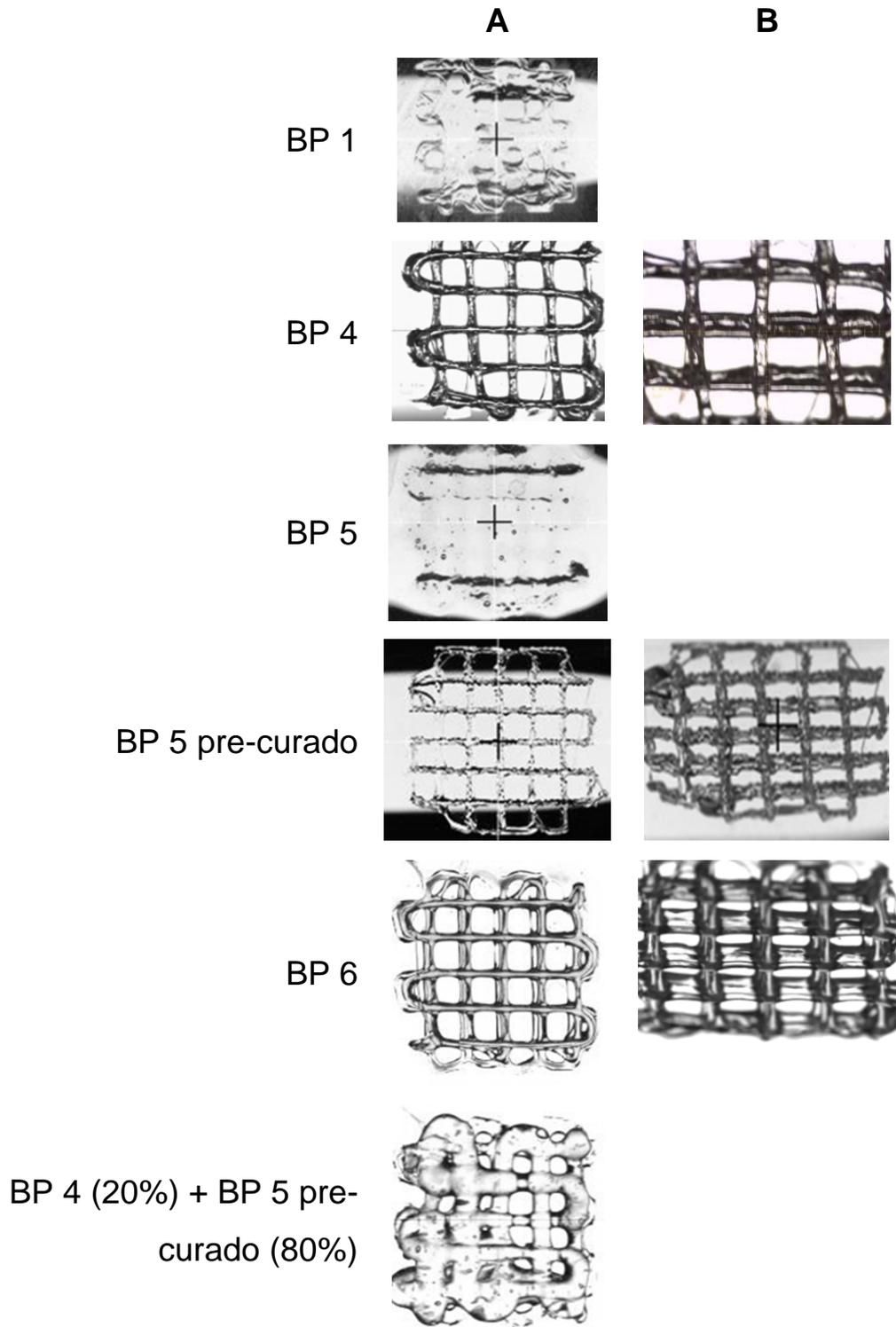


FIG. 26

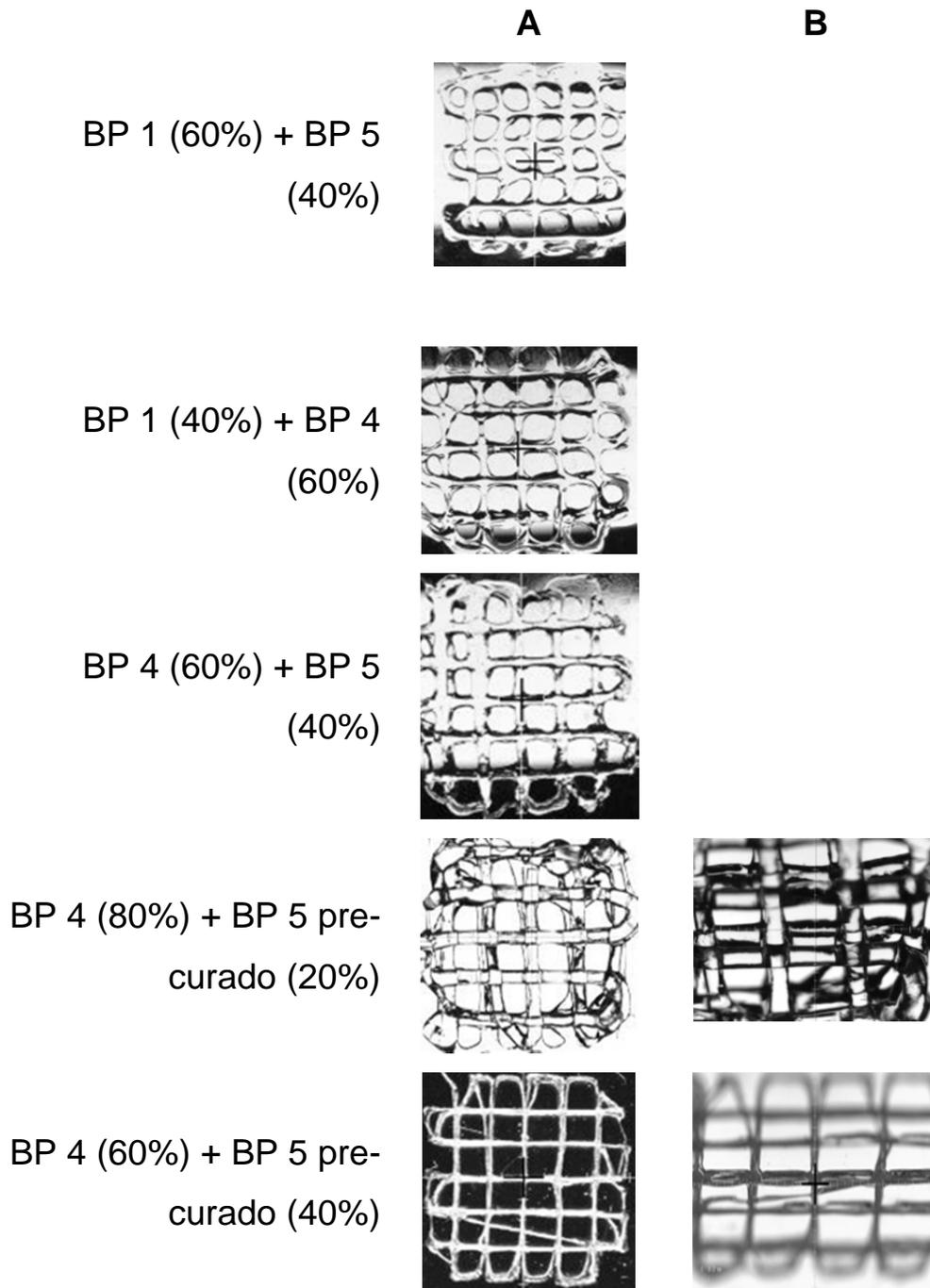


FIG. 26 (cont.)

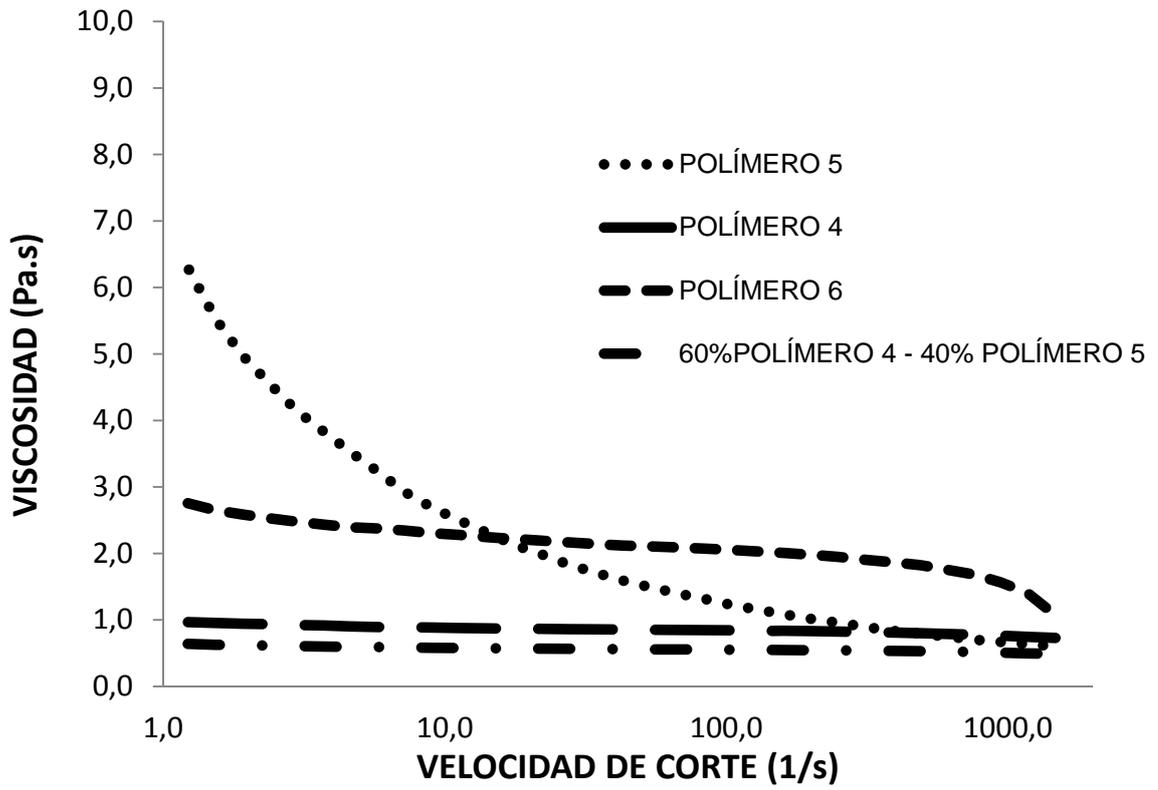


FIG. 27

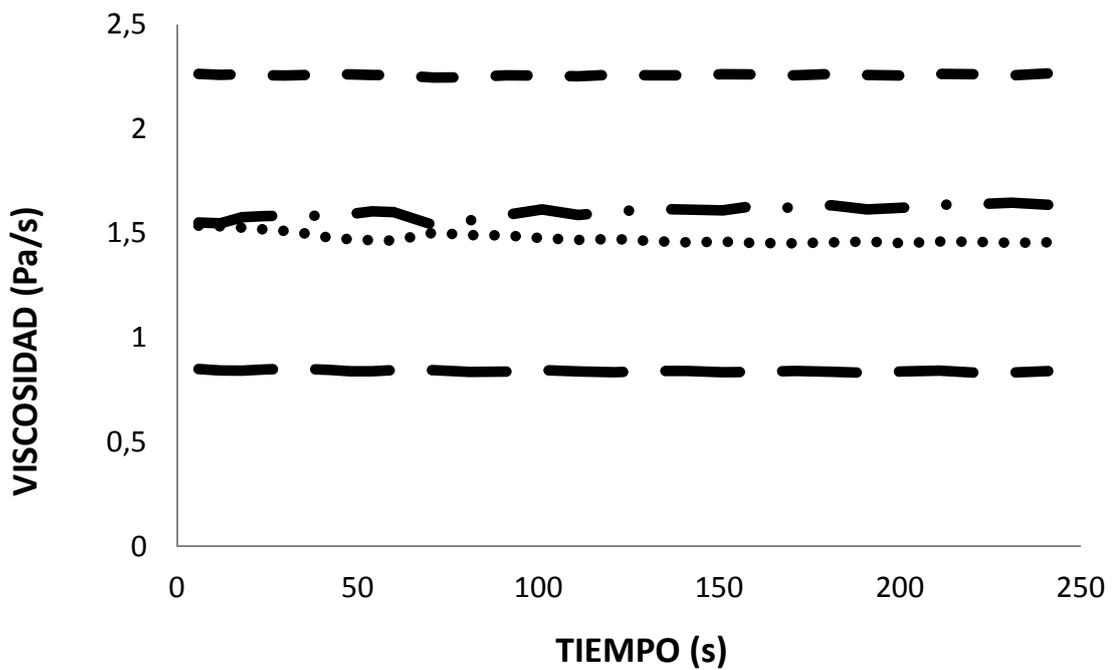


FIG. 28

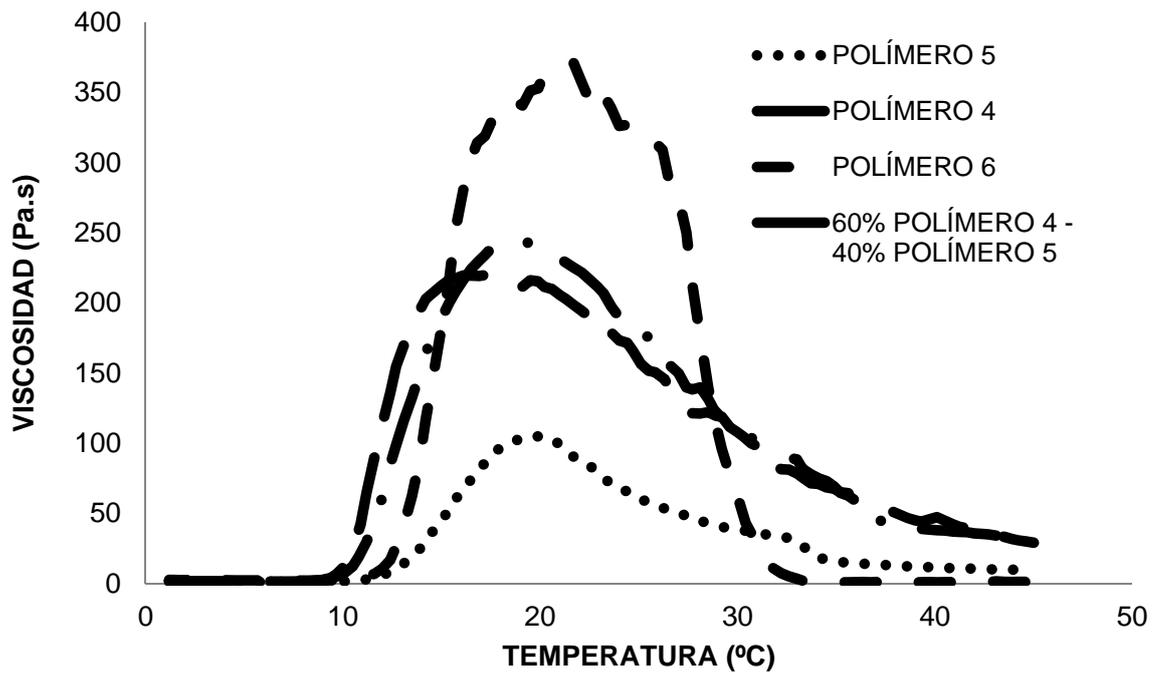


FIG. 29

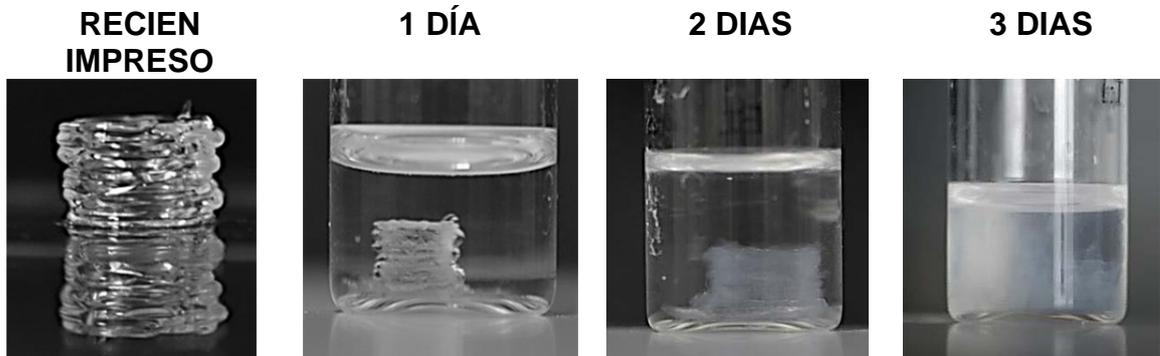


FIG. 30



FIG. 31

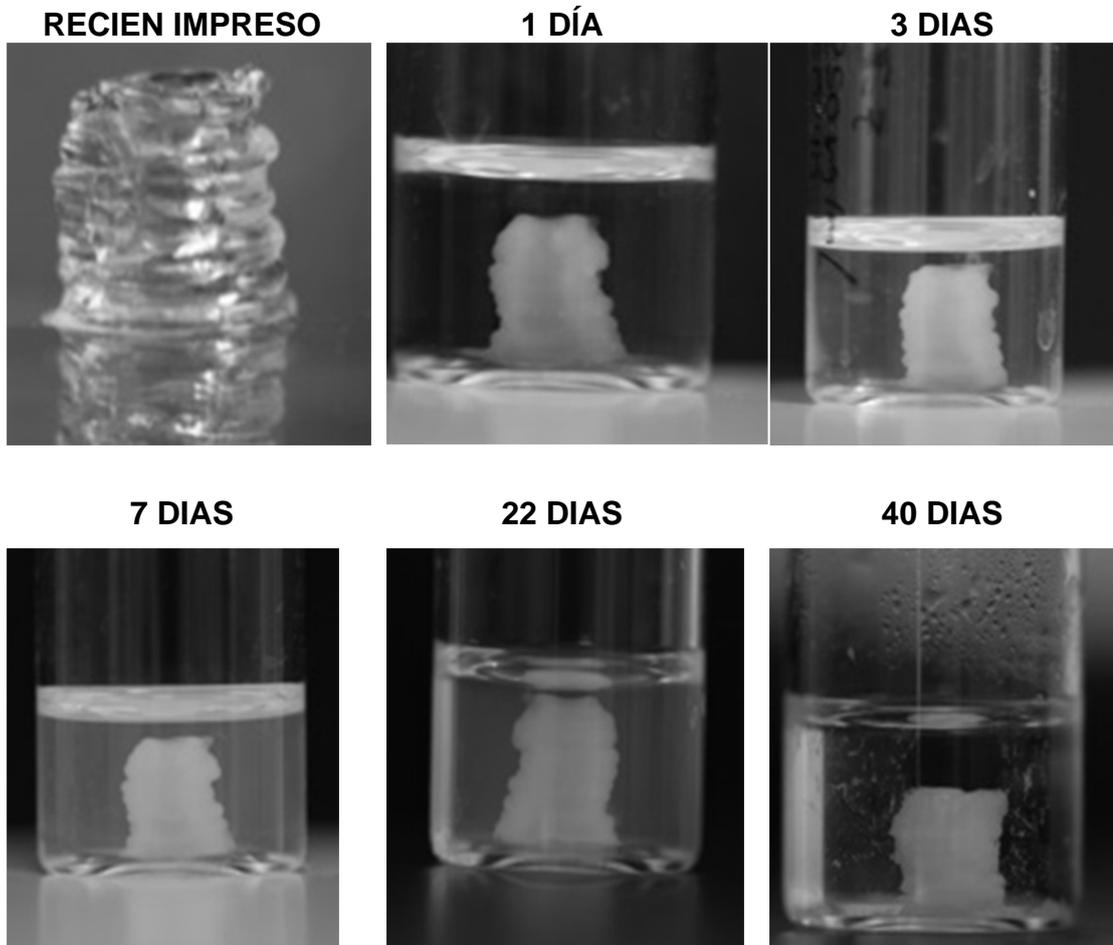


FIG. 32

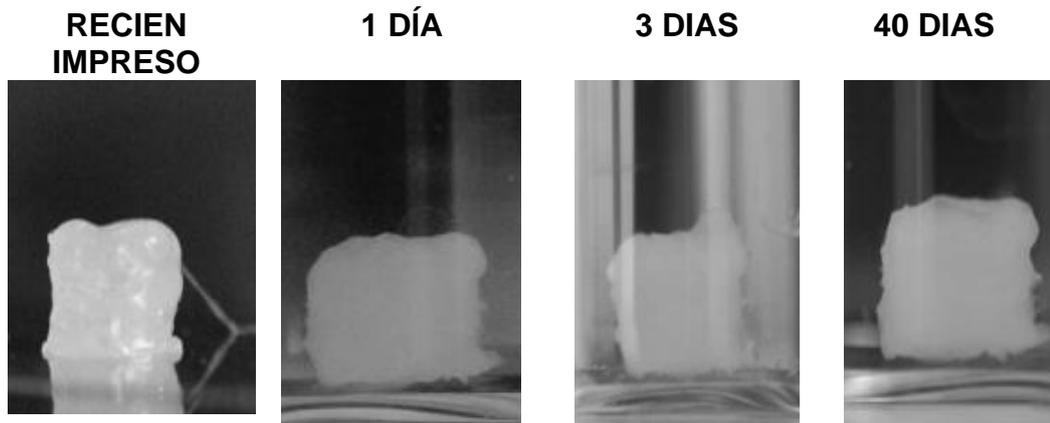


FIG. 33

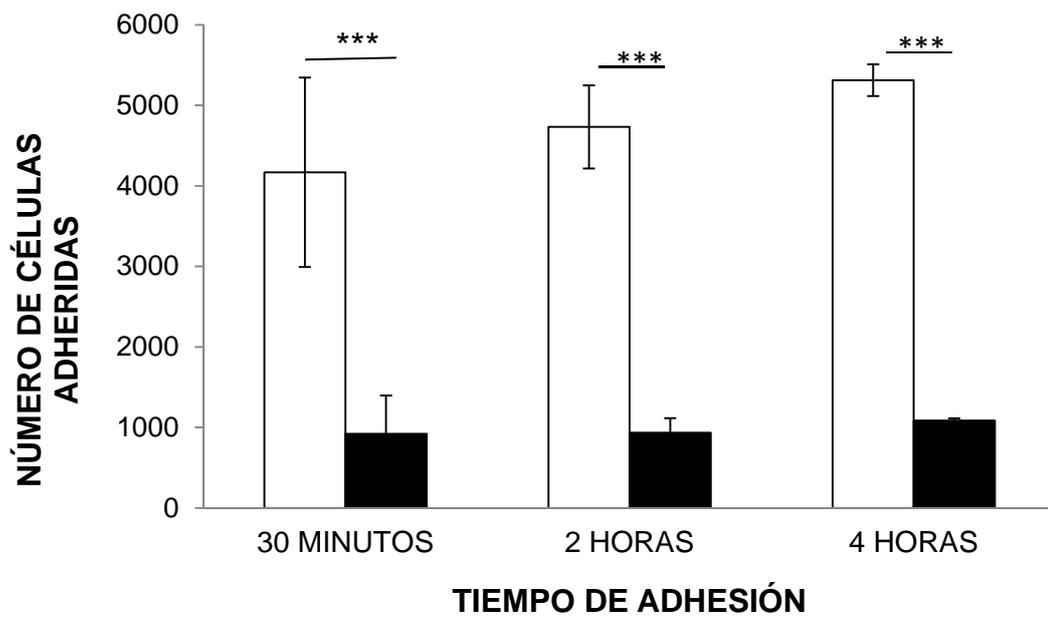


FIG. 34

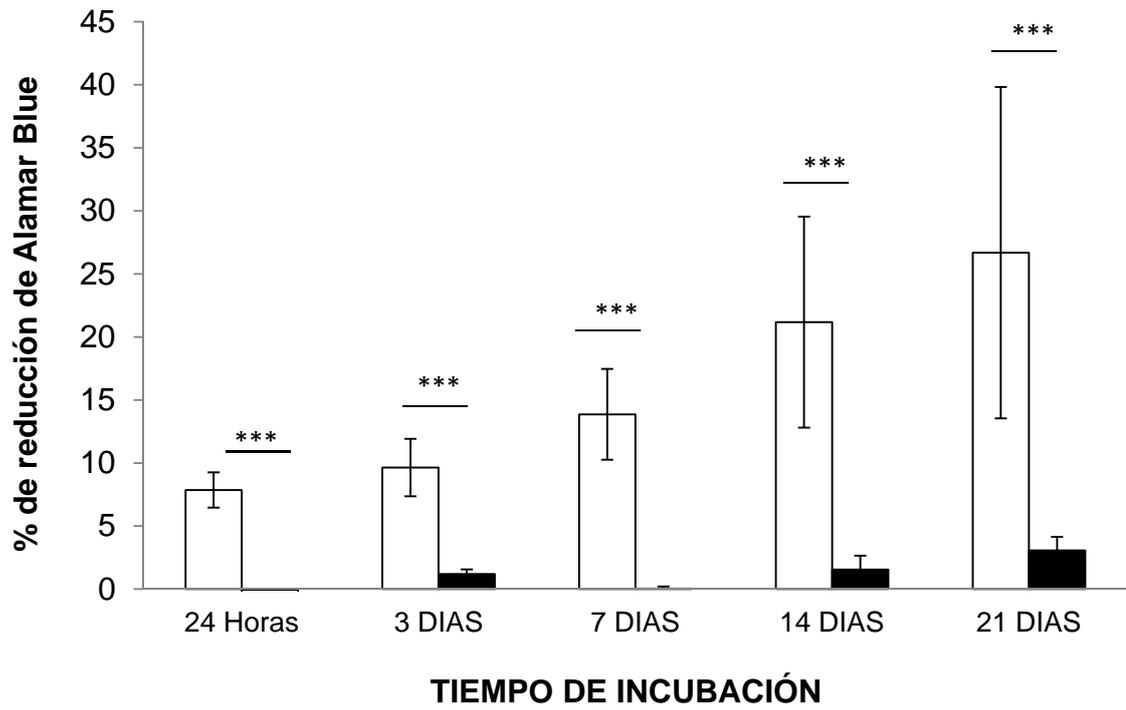


FIG. 35

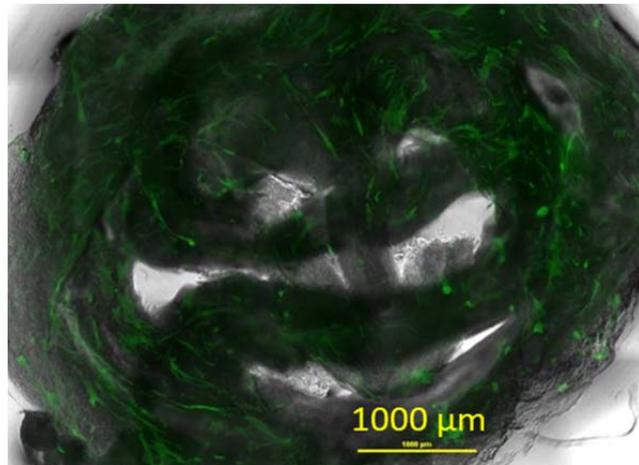


FIG. 36

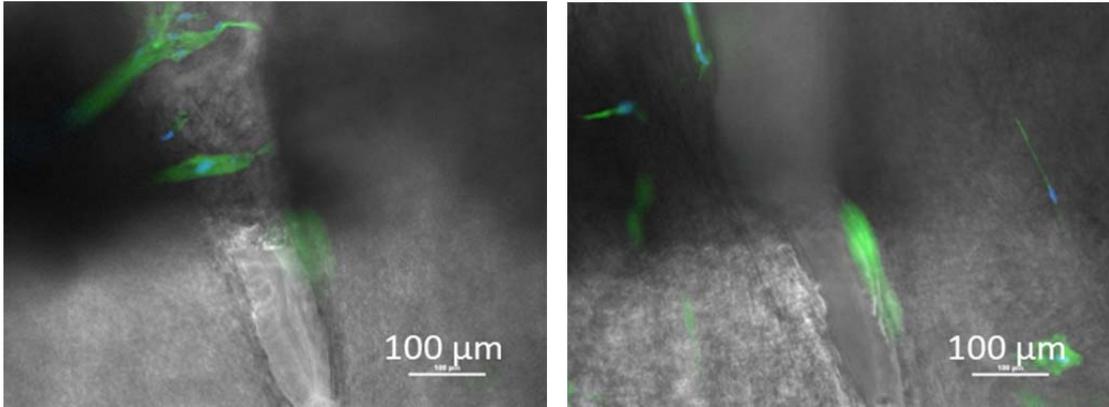


FIG. 37



- ②① N.º solicitud: 201831008
②② Fecha de presentación de la solicitud: 17.10.2018
③② Fecha de prioridad:

INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TÉCNICA

⑤① Int. Cl.: Ver Hoja Adicional

DOCUMENTOS RELEVANTES

Categoría	⑤⑥ Documentos citados	Reivindicaciones afectadas
X	FERNÁNDEZ-COLINO, ALICIA, et al. . Amphiphilic elastin-like block co-recombinamers containing leucine zippers: Cooperative interplay between both domains results in injectable and stable hydrogels. Biomacromolecules, 2015, Vol. 16, Páginas 3389-3398. Página 3389-3391 y tabla 1.	1, 5-6, 11-14
X	PÉREZ DEL RÍO, EDUARDO, et al. Síntesis y caracterización de nuevos polímeros recombinantes tipo elastina fusionados a eGFP para la formación de nanopartículas. . Universidad de Valladolid, 2015. Páginas 3, 5—17 y 25-28	1-3, 5, 7, 11-16, 18, 20 y 23.
X	ZOU, YU, et al. Diseño y síntesis de un nuevo biomaterial recombinante para uso en regeneración tisular neuronal. Universidad de Valladolid, 2017. Páginas 1-2, 8-18.	1-5, 7, 11-13, 15-16 y 23.
A	WO 2014/041231 A1 (UNIVERSIDAD DE VALLADOLID) 20/03/2014, Todo el documento.	1-23
A	EP 2641965 A1 (PARC CIENTÍFIC BARCELONA) 25/09/2013, Todo el documento.	1-23
A	ES 2344097 B1 (UNIVERSIDAD DE VALLADOLID) 17/08/2010, Todo el documento.	1-23

Categoría de los documentos citados

X: de particular relevancia
Y: de particular relevancia combinado con otro/s de la misma categoría
A: refleja el estado de la técnica

O: referido a divulgación no escrita
P: publicado entre la fecha de prioridad y la de presentación de la solicitud
E: documento anterior, pero publicado después de la fecha de presentación de la solicitud

El presente informe ha sido realizado

para todas las reivindicaciones

para las reivindicaciones nº:

<p>Fecha de realización del informe 17.05.2019</p>	<p>Examinador M. J. García Bueno</p>	<p>Página 1/3</p>
---	---	------------------------------



- ②¹ N.º solicitud: 201831008
②² Fecha de presentación de la solicitud: 17.10.2018
③² Fecha de prioridad:

INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TÉCNICA

⑤¹ Int. Cl.: Ver Hoja Adicional

DOCUMENTOS RELEVANTES

Categoría	⑤ ⁶ Documentos citados	Reivindicaciones afectadas
A	IBÁÑEZ-FONSECA, A., et al. Regeneración ósea en fémur de conejo mediante el implante de una matriz bioactiva basada en recombinámeros de tipo elastina (ELRs). LIBRO DE ACTAS, XXXIII Congreso Anual de la Sociedad Española de Ingeniería Biomédica, noviembre 2015, Páginas 331-33. Todo el documento	1-23
A	MISBAH, M. HAMED, et al. . Formation of calcium phosphate nanostructures under the influence of self-assembling hybrid elastin-like-statherin recombinamers. RSC advances, 2016, Vol. 6, Páginas 31225-31234. Todo el documento.	1-23
A	JAVIER ARIAS, F., et al. . Recent contributions of elastin-like recombinamers to biomedicine and nanotechnology. Current topics in medicinal chemistry, 2014, Vol. 14, Páginas 819-836. Todo el documento.	1-23

Categoría de los documentos citados

X: de particular relevancia

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

A: refleja el estado de la técnica

O: referido a divulgación no escrita

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

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

El presente informe ha sido realizado

para todas las reivindicaciones

para las reivindicaciones nº:

Fecha de realización del informe
17.05.2019

Examinador
M. J. García Bueno

Página
2/3

CLASIFICACIÓN OBJETO DE LA SOLICITUD

C07K14/78 (2006.01)
A61L27/52 (2006.01)
A61L27/36 (2006.01)
A61L27/22 (2006.01)
C09D11/00 (2014.01)
C12N15/00 (2006.01)

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

C07K, A61L, C09D, C12N

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

INVENES, EPODOC, WPI, TXTE, XPESP, NPL, MEDLINE, BIOSIS, EMBASE, EMBL ALL, INTERNET.