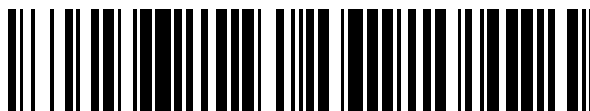


19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 374 428**

51 Int. Cl.:  
**C09D 189/00** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 96 Número de solicitud europea: **06813260 .4**  
96 Fecha de presentación: **28.07.2006**  
97 Número de publicación de la solicitud: **1915436**  
97 Fecha de publicación de la solicitud: **30.04.2008**

54 Título: **MÉTODOS PARA LA DEPOSICIÓN PROGRESIVA DE RECUBRIMIENTOS DE FIBROÍNA DE SEDA.**

30 Prioridad:  
**02.08.2005 US 704622 P**  
**21.10.2005 US 728837 P**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:  
**16.02.2012**

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:  
**16.02.2012**

73 Titular/es:  
**TRUSTEES OF TUFTS COLLEGE**  
**BALLOU HALL**  
**MEDFORD, MA 02155, US**

72 Inventor/es:  
**KAPLAN, David, L. y**  
**WANG, Xianyan**

74 Agente: **Lazcano Gainza, Jesús**

**ES 2 374 428 T3**

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín europeo de patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre concesión de Patentes Europeas).

## DESCRIPCIÓN

Métodos para la deposición progresiva de recubrimientos de fibroína de seda

5 **Campo de la invención**

La invención se refiere en general a métodos para preparar recubrimientos de biomaterial de seda con disoluciones de fibroína de seda en las que el grosor y la estructura del recubrimiento de biomaterial pueden controlarse. También se describen composiciones farmacéuticas y dispositivos médicos recubiertos.

10

**Antecedentes de la invención**

Hay una necesidad crítica en el campo de la ciencia de biomateriales de desarrollar métodos sencillos para el ensamblaje de recubrimientos de biomaterial controlados, biocompatibles y funcionalizados. Se han desarrollado numerosas técnicas de modificación con el objetivo de confeccionar una superficie del material con biocompatibilidad y bioactividad deseadas, incluyendo el injerto químico de grupos funcionales y la fisisorción de moléculas específicas. Mientras que estos métodos son eficaces para necesidades específicas, también presentan limitaciones con respecto a la complejidad del procesamiento, la pérdida de bioactividad de las biomoléculas que van a suministrarse y el control limitado de la biodegradación.

20

La técnica de ensamblaje capa a capa ("*layer-by-layer*", LbL) ofrece una estrategia alterna para formar recubrimientos de superficie biofuncionalizados. La LbL tradicional que Iler y Decher *et al.* (Iler, R.K. J. Colloid Interface Sci., 1966, 21, 569-594; Decher, *et al.* Thin Solid Films, 1992, 210/211, 831-835; Decher, G. Science, 1997, 277, 1232-1237) aplicaron por primera vez se basa en la deposición alterna de polielectrolitos cargados de manera opuesta, formando capas interpenetrantes de sales poliméricas. La fuerza impulsora de este ensamblaje LbL es principalmente la interacción electrostática, aunque el proceso también puede implicar interacciones de transferencia de carga, interacciones de van der Waals, puentes de hidrógeno e interacciones hidrófobas de corto alcance (Kotov, N.A., NanoStructured Materials, 1999, 12, 789; Lojou, E.; *et al.*, 2003, 20, 748-755). El procedimiento es fácil, barato y muy versátil. Los recubrimientos pueden formarse sobre prácticamente cualquier sustrato de casi cualquier forma y tamaño y generalmente no requieren procesamiento químico intenso. Por tanto, es posible incorporar materiales con funciones deseadas en estos recubrimientos, incluyendo fármacos farmacológicos, factores de crecimiento y proteínas de señalización (Jessel, N. *et al.* Advanced Materials, 2003, 15, 692-695). Estas funcionalidades pueden o bien ser una de las capas de polielectrolitos en el ensamblaje o bien estar atrapadas entre capas con un control a escala de nanómetros o micrómetros.

35

Los estudios fundamentales y aplicados de recubrimientos LbL en cuanto a aplicaciones biológicas incluyen la fabricación de películas diseñadas para promover o inhibir la unión de células (Elbert, D.L. *et al.* Langmuir, 1999, 15, 5355-5362; Serizawa, T. *et al.* Biomacromolecules, 2002, 3, 724-731), la inmovilización de células vivas (Chluba, J. *et al.* Biomacromolecules, 2001, 2, 800-805; Grant, G. G. S. *et al.* Biomed. Microdevices, 2001, 4, 301-306), la inmovilización de enzimas activas (Jin, W. *et al.* Chem. Soc. 2001, 123, 8121-8122; Lvov, Y. *et al.* Nano Lett. 2001, 1, 125-128; Tiourina, O. P. *et al.* Macromol. Biosci. 2001, 1, 209-214) y la liberación sostenida de ADN funcional (Zhang, J. T. *et al.* Langmuir, 2004, 20, 8015-8021).

40

En la última década, el uso de fibroína de seda como biomaterial se ha ampliado a estudios *in vitro* e *in vivo* debido a la combinación única de propiedades biocompatibles y estructurales mecánicas presentadas por esta proteína (Sakabe, H. *et al.* Sen-i Gakkaishi, 1989, 45, 487-490; Park, W. H. *et al.* Fibers Polym, 2001, 2, 58-63; Santin, M. *et al.* J Biomed Mater Res., 1999, 46, 382-389). Estudios exhaustivos de las propiedades mecánicas y la respuesta inflamatoria sugieren que la fibroína de seda como una importante opción de material en los campos de liberación controlada, biomateriales y armazones (Meinel, L. Hofmann, *et al.* Biomaterials, 2005, 26, 147-155). Se ha procesado satisfactoriamente fibroína de seda regenerada para dar películas, geles, esterillas de fibras electrohiladas y armazones porosos tridimensionales (Min, B.-M. *et al.* Biomaterials, 2004, 25, 1289-1297; Kim, H. J. *et al.* Biomaterials, 2005, 26, 4442-4452). Además, se han optimizado recientemente disoluciones acuosas de estas proteínas (Kim, U. J. Biomaterials, 2005, 26, 2775-2785).

50

Sin embargo, aunque se ha demostrado que los materiales de fibroína de seda tienen un potencial prometedor, sigue por determinarse un medio para controlar adecuadamente el ensamblaje de recubrimientos de fibroína de seda que tienen propiedades especificadas incluyendo grosor, química de superficie y estructura definidos es importante para funcionalizar superficies de biomateriales a base de proteína para aplicaciones tales como recubrimientos de dispositivos médicos y armazones de ingeniería de tejidos. Además, un procedimiento de ensamblaje estrechamente controlado es una necesidad clara para el desarrollo de productos farmacéuticos, por ejemplo biomateriales de liberación controlada. Además, procesos que pueden funcionar en un modo de todo agua ofrecen importantes beneficios a la conservación de la función de compuestos sensibles, células u otros componentes que pueden atraparse o arrastrarse en las capas o los dispositivos.

65

## Sumario de la invención

La presente invención proporciona métodos para el ensamblaje controlado de películas estratificadas de fibroína de seda. Análogos a las técnicas LbL tradicionales, los métodos de la invención permiten el control de la química de superficie, el grosor, la morfología y la estructura de recubrimientos de película delgada o recubrimientos a granel, así como la inclusión de componentes biológicos lábiles, fármacos, citocinas, ADN y células o virus para generar recubrimientos funcionales. Los métodos descritos en el presente documento proporcionan un avance importante con respecto al estado actual de la técnica en la modificación de superficie de biomateriales porque las propiedades de los recubrimientos de fibroína de seda a nanoescala pueden controlarse y los recubrimientos pueden formarse sobre prácticamente cualquier sustrato de cualquier material, forma o tamaño. Además, los métodos pueden realizarse en todo agua y no requieren procesamiento químico intenso permitiendo el atrapamiento controlado de moléculas lábiles. Además, a diferencia de las técnicas LbL tradicionales que requieren cargas apropiadas o grupos funcionales para la acumulación de los recubrimientos, el control estructural de la proteína de seda garantiza las características de los recubrimientos debido a reticulación física (láminas beta), dando como resultado un material robusto y estable que no requiere ninguna reacción de reticulación electromagnética o química específica, mejorando adicionalmente la estabilidad de las moléculas atrapadas o los componentes sensibles.

Se proporciona un método para preparar un recubrimiento de biomaterial de seda estratificado sobre un sustrato.

El método comprende, a) poner en contacto un sustrato con una disolución de fibroína de seda de manera que la disolución forma una primera capa sobre el sustrato, se prefiere una disolución de fibroína de seda acuosa, b) deshidratar dicha capa mediante la exposición de la capa a un flujo de gas de deshidratación, c) poner en contacto la primera capa deshidratada con una disolución de fibroína de seda de manera que la disolución forma una segunda capa sobre la primera capa deshidratada, d) deshidratar dicha segunda capa mediante la exposición de la segunda capa a un flujo de gas de deshidratación; y repetir las etapas c) y d) hasta que se deposita el número deseado de capas sobre el sustrato dando como resultado un recubrimiento estratificado sobre dicho sustrato. En una realización preferida, al menos un agente contiene un agente bioactivo, por ejemplo, un agente terapéutico. Una o más capas que no contienen agente bioactivo añadido (capa de barrera) pueden depositarse sobre las capas que contienen el agente bioactivo para controlar la liberación y/o limitar el aumento súbito inicial del agente.

En una realización cada capa se lava con agua, preferiblemente desionizada, antes de la deshidratación. Las capas también pueden lavarse con una disolución de metanol o una disolución de agua/metanol.

En una realización preferida el gas usado para la deshidratación es gas nitrógeno (N<sub>2</sub>), sin embargo, cualquier gas con propiedades deshidratantes, tal como CO<sub>2</sub> o aire caliente, puede usarse para secar/deshidratar las capas.

El método de la invención permite controlar el grosor de cada capa depositada. Además, cada una de las etapas para preparar el recubrimiento de biomaterial de seda estratificado puede automatizarse.

En una realización, se producen capas a nanoescala y el grosor de cada capa oscila en grosor entre aproximadamente 1 y aproximadamente 12 nanómetros. Alternativamente, se producen capas a granel (capas que oscilan en grosor entre décimas y milésimas de nanómetros) usando los métodos de la invención.

En una realización, el grosor de cada capa depositada se controla controlando la concentración de sal en la disolución de fibroína de seda usada para formar la capa. La concentración de sal se aumenta para favorecer la deposición de fibroína de seda sobre el sustrato, o sobre una capa de fibroína de seda deshidratada sobre el sustrato. La concentración de sal oscila entre 0 y 1,0 M.

En una realización, el grosor de cada capa depositada se controla controlando la concentración de fibroína en la disolución de fibroína de seda usada para formar la capa. La concentración de fibroína en la disolución de fibroína de seda se aumenta para favorecer la deposición de fibroína de seda sobre dicho sustrato o sobre una capa de fibroína de seda deshidratada sobre el sustrato.

En una realización, el grosor de cada capa depositada se controla controlando el pH de la disolución de fibroína de seda usada para formar la capa. Cuando el sustrato es un sustrato cargado negativamente, el pH de la disolución de fibroína de seda se reduce con el fin de favorecer la deposición de la fibroína de seda sobre dicho sustrato o sobre la capa deshidratada. Mientras que, cuando el sustrato es un sustrato cargado positivamente, el pH de la disolución de fibroína de seda se aumenta con el fin de favorecer la deposición de la fibroína de seda sobre dicho sustrato, o sobre una capa de fibroína de seda deshidratada sobre el sustrato.

En una realización, el grosor de cada capa depositada se controla controlando la razón de metanol con respecto a agua usada como medio de enjuagado. Un contenido en metanol superior favorece la deposición de fibroína de seda sobre dicho sustrato o sobre una capa de fibroína de seda deshidratada sobre el sustrato. La razón en volumen de metanol/agua oscila preferiblemente entre 50/50 y 90/10.

En una realización, la disolución de fibroína de seda usada en los métodos de la invención se obtiene a partir de una

disolución que contiene una seda de gusano de seda disuelta, tal como, por ejemplo, de *Bombyx mori*. Alternativamente, la disolución de fibroína de seda se obtiene a partir de una disolución que contiene una seda de araña disuelta, tal como, por ejemplo, de *Nephila clavipes*. La disolución de fibroína de seda también puede obtenerse a partir de una disolución que contiene una seda modificada por ingeniería genética. En una realización, la seda modificada por ingeniería genética comprende un agente terapéutico. Esto puede ser una proteína de fusión con una citocina, una enzima, o cualquier número de hormonas o fármacos a base de péptidos, antimicrobianos y sustratos relacionados.

Los métodos de la invención pueden realizarse en ausencia de cualquier disolvente orgánico. Por tanto, estos métodos son particularmente susceptibles a la incorporación de moléculas lábiles, tales como agentes bioactivos o productos terapéuticos, y pueden usarse para producir biomateriales de liberación controlada. Preferiblemente, el método se realiza sólo en agua.

En una realización, el recubrimiento estratificado es biodegradable y la tasa de degradación del recubrimiento se controla ajustando la cantidad de hidratación de cada capa. Cuanto más alto sea el contenido en hidratación más degradable será. Esta característica se relaciona directamente con el estado estructural ya que más estructura de lámina beta da como resultado hidratación inferior y más estabilidad de las capas. El nivel de hidratación se controla aumentando o disminuyendo la cantidad de tiempo que se expone la capa al gas de deshidratación. El tiempo de exposición oscila entre aproximadamente 30 segundos y aproximadamente 3 minutos.

Los métodos de la invención pueden usarse para recubrir cualquier sustrato. El sustrato puede ser de naturaleza sintética o natural. Por ejemplo, el sustrato puede estar hecho de plástico, madera, vidrio, cuero, tela, fibras sintéticas, cerámica, metal o aleación.

Además, el sustrato puede ser de cualquier tamaño o forma. Diversos artículos conformados incluyendo dispositivos biomédicos, biomateriales, biosensores y armazones de ingeniería de tejidos pueden estratificarse fácilmente con fibroína de seda usando los métodos de la invención.

En una realización preferida, el sustrato usado en los métodos de la invención es un dispositivo biomédico, tal como una endoprótesis. Puede recubrirse cualquier dispositivo biomédico usando los métodos de la invención. Por ejemplo, suturas, mallas, placas, tornillos, cementos, marcapasos, catéteres y dispositivos relacionados u otros tipos de dispositivos médicos.

La invención proporciona además un recubrimiento de biomaterial de fibroína de seda que oscila entre aproximadamente 1 y aproximadamente 12 nm de grosor, y un recubrimiento de biomaterial de fibroína de seda estratificado que comprende capas de fibroína de seda de aproximadamente 1 a aproximadamente 12 nm de grosor. En una realización preferida, el recubrimiento de fibroína de seda comprende además un agente bioactivo.

La invención también proporciona dispositivos biomédicos y armazones de ingeniería de tejidos que comprenden un recubrimiento de biomaterial de fibroína de seda de aproximadamente 1 a aproximadamente 12 nm, o un recubrimiento de biomaterial de fibroína de seda estratificado que comprende capas de fibroína de seda de aproximadamente 1 a aproximadamente 12 nm de grosor. En una realización preferida el recubrimiento de fibroína de seda presente sobre el dispositivo biomédico o armazón de ingeniería de tejidos comprende además un agente bioactivo. El agente bioactivo se añade preferiblemente a la disolución de fibroína de seda. La cantidad de agente dentro de cada capa puede controlarse ajustando la concentración del agente en la disolución de fibroína de seda. Adicionalmente, la cantidad del agente puede controlarse mediante la estructura del recubrimiento y el método de enjuagado. Además, se logra la supresión del aumento súbito inicial del agente y la prolongación de la liberación, por ejemplo, controlando la estructura del recubrimiento, por ejemplo, incluyendo una estructura cristalina y la adición de capas de barrera.

### Breve descripción de los dibujos

Los dibujos adjuntos, que se incorporan en y constituyen una parte de esta memoria descriptiva, ilustran realizaciones de la invención y, junto con la descripción, sirven para explicar los objetos, ventajas y principios de la invención.

La figura 1 muestra los espectros de absorción de UV-visible de películas de seda de múltiples capas sobre portaobjetos de cuarzo como una función del número de etapas de deposición. Las curvas, desde la parte inferior a la superior, corresponden a la adsorción de 2, 4, 6, 8, 10 y 12 capas, respectivamente. El diagrama muestra un aumento lineal de la absorbancia a 228 nm con el número de capas.

La figura 2 muestra la absorbancia de UV-visible a 228 nm de películas de seda de 12 capas sobre portaobjetos de cuarzo como una función de la concentración de la disolución de inmersión y el método de estabilización de enjuagado. Se registraron valores de absorbancia en 3 ubicaciones diferentes sobre el sustrato para cada muestra.

Las figuras 3A y 3B muestran la caracterización con microbalanza de cristal de cuarzo para investigación de los

recubrimientos: desplazamiento de frecuencia y grosor de recubrimiento de cada capa ensamblada a partir de una disolución de fibroína de seda 1 mg/ml en ausencia y presencia de NaCl 0,2, 0,5 y 1,0 M.

5 La figura 4 muestra el cambio de frecuencia *in situ* de la microbalanza de cristal de cuarzo para investigación como una función del tiempo de deposición. El diagrama muestra el cambio de masa calculado a partir de la ecuación de Sauerbrey como una función del tiempo de deposición.

10 La figura 5 muestra un esquema de la base mecánica de los efectos de la superficie del sustrato y la sal sobre la deposición de fibroína de seda a partir de la disolución.

Las figuras 6A a 6B muestran los espectros de ATR-FTIR de un recubrimiento de múltiples capas de seda antes y después del tratamiento con metanol (figura 6A, después del tratamiento con metanol; figura 6B antes del tratamiento con metanol). Se observó seda II (amida I de  $1622\text{ cm}^{-1}$ ) en ambas condiciones.

15 La figura 7 muestra la absorbancia de SUV de portaobjetos de cuarzo recubiertos con 6 capas de seda (A, sin tratamiento con metanol; B, con tratamiento con metanol) incubados en PBS y DMEM a  $37^{\circ}\text{C}$  durante 7 días. Se registró la absorbancia en 3 ubicaciones diferentes sobre el sustrato para cada muestra.

20 La figura 8 muestra la caracterización con microbalanza de cristal de cuarzo para investigación de los recubrimientos: desplazamiento de frecuencia de cada capa ensamblada a partir de disoluciones de dexametasona y fibroína de seda 1 mg/ml.

25 La figura 9 muestra la monitorización en tiempo real de la deposición de compuestos modelo sobre un electrodo de oro recubierto previamente con seda usando una microbalanza de cristal de cuarzo para investigación (RQCM).

30 Las figuras 10A-D muestran el aumento lineal de la rodamina B (A) y azoalbúmina (B) incorporada como función del número de etapas de deposición. Las curvas, en la dirección de las flechas, corresponden a la adsorción de 1 a 7 capas de rodamina B y de 2 a 12 capas de azoalbúmina, respectivamente. Los diagramas muestran un aumento lineal de absorbancia a 562 nm y 349 nm con el número de capas de rodamina B y azoalbúmina, respectivamente. El comportamiento de liberación de rodamina B (C) y azoalbúmina (D) en PBS a TA. El subíndice corresponde al número de capas en el mismo. Los valores representan el promedio de dos experimentos de liberación.

La figura 11 muestra el número relativo de plaquetas en cada tipo de muestra.

### 35 Descripción detallada de la invención

Se describen métodos para el ensamblaje controlado de películas de fibroína de seda usando disoluciones de fibroína de seda. Estos métodos proporcionan un procedimiento de deposición progresiva único de películas de fibroína de seda que permite un alto grado de control con respecto al grosor de las capas de fibroína y que, si se desea, puede realizarse en ausencia de disolventes orgánicos como un procedimiento completamente acuoso. Los métodos descritos en el presente documento permiten el ensamblaje de recubrimientos de fibroína de seda biocompatibles que pueden funcionalizarse mediante la incorporación específica de moléculas bioactivas para su uso en aplicaciones tales como recubrimientos de dispositivos médicos, biomateriales de liberación controlada, armazones de ingeniería de tejidos, recubrimientos antibacterianos, sistemas de biosensores y parches de cicatrización de heridas.

50 También se proporciona un método de deposición progresiva para preparar un recubrimiento de biomaterial de seda sobre un sustrato. El método comprende poner en contacto un sustrato con una disolución de fibroína de seda acuosa de manera que la disolución acuosa forma una capa sobre el sustrato. Entonces se deshidrata la capa mediante la exposición de la capa a un flujo de gas de deshidratación. Tras deshidratar, se añade una capa posterior de disolución de fibroína de seda acuosa sobre la capa previa y se deshidrata. Este procedimiento de deposición progresiva se repite hasta que se logra el número deseado de capas de fibroína de seda.

55 Tal como se usa en el presente documento, la frase "poner en contacto un sustrato" o "poner en contacto una capa deshidratada" se refiere a cualquier medio para aplicar una disolución de seda a un sustrato. Por ejemplo, la disolución de seda acuosa puede verterse, o pulverizarse, sobre el sustrato o capa deshidratada o bien con o bien sin la ayuda de una estructura de colada. Alternativamente, el sustrato, o sustrato que comprende una capa de fibroína deshidratada, puede sumergirse en la disolución de fibroína de seda. También se contemplan medios automatizados.

60 Tal como se usa en el presente documento, el término "fibroína" incluye fibroína de gusano de seda y proteína de la seda de insectos o arañas (Lucas *et al.*, Adv. Protein Chem 13: 107-242 (1958)). Preferiblemente, la fibroína se obtiene a partir de una disolución que contiene una seda de araña o seda de gusano de seda disuelta. La proteína de seda de gusano de seda se obtiene, por ejemplo, de *Bombyx mori*, y la seda de araña se obtiene de *Nephila clavipes*. Como alternativa, las proteínas de seda adecuadas para su uso en la presente invención pueden obtenerse a partir de una disolución que contiene una seda modificada por ingeniería genética, tal como a partir de

bacterias, levadura, células de mamífero, animales transgénicos o plantas transgénicas. Véanse, por ejemplo, el documento WO 97/08315 y la patente estadounidense 5.245.012.

5 La disolución de fibroína de seda puede prepararse mediante cualquier método convencional conocido por un experto en la técnica. Preferiblemente, la disolución es una disolución acuosa. Por ejemplo, se hierven capullos de *B. mori* durante aproximadamente 30 minutos en una disolución acuosa. Preferiblemente, la disolución acuosa es  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  aproximadamente 0,02 M. Los capullos se enjuagan, por ejemplo, con agua para extraer las proteínas sericina y la seda extraída se disuelve en una disolución salina acuosa. Las sales útiles para este fin incluyen bromuro de litio, tiocianato de litio, nitrato de calcio u otros compuestos químicos que pueden solubilizar la seda.  
10 Preferiblemente, la seda extraída se disuelve en disolución de LiBr aproximadamente 9-12 M. La sal se elimina posteriormente usando, por ejemplo, diálisis.

Si es necesario, la disolución puede concentrarse usando, por ejemplo, diálisis frente a un polímero higroscópico, por ejemplo, PEG, un óxido de polietileno, amilosa o sericina. Esto generaría películas más gruesas.

15 Preferiblemente, el PEG es de un peso molecular de 8.000-10.000 g/mol y tiene una concentración del 25 - 50%. Se usa preferiblemente un casete de diálisis Slide-a-lyzer (Pierce, MW CO 3500). Sin embargo, puede usarse cualquier sistema de diálisis. La diálisis es durante un periodo de tiempo suficiente para dar como resultado una concentración final de disolución de seda acuosa entre el 10 - 30%. En la mayoría de los casos es suficiente una diálisis durante 2 -  
20 12 horas.

Alternativamente, la disolución de fibroína de seda puede producirse usando disolventes orgánicos. Tales métodos se han descrito, por ejemplo, en Li, M., *et al.*, J. Appl. Poly Sci. 2001, 79, 2192-2199; Min, S., *et al.* Sen'i Gakkaishi 1997, 54, 85-92; Nazarov, R. *et al.*, Biomacromolecules mayo-junio de 2004;5(3):718-26.

25 Se describen disoluciones de fibroína de seda acuosas concentradas y métodos para preparar las mismas en la publicación PCT PCT/US04/11199.

En los métodos de la invención, las capas de fibroína de seda acuosas depositadas se deshidratan usando una corriente o flujo suave de gas de deshidratación. Puede usarse cualquier gas con propiedades deshidratantes para deshidratar las capas de fibroína de seda acuosas, por ejemplo,  $\text{CO}_2$ ,  $\text{N}_2$  o aire caliente. Además, los expertos en la técnica conocen medios para gases de deshidratación.

35 En una realización preferida, el gas de deshidratación es  $\text{N}_2$ . Preferiblemente, el gas de deshidratación induce una estructura de lámina  $\beta$  de fibroína, por ejemplo cuando se desea la incorporación de un material bioactivo. Las capas pueden deshidratarse hasta diversos grados cambiando la cantidad de tiempo que cada capa se expone a la corriente de gas.

Tal como se usa en el presente documento, el término "deshidratación" se refiere a la eliminación de cualquier cantidad de agua, por ejemplo, la eliminación del 5-15%, el 15-35%, el 35-50%, el 50%-75%, el 75-90% o el 90%-100% del agua.

45 En los métodos de la invención, pueden atraparse o inmovilizarse diferentes componentes o materiales bioactivos (por ejemplo polímeros biocompatibles) en diferentes capas, o en diferentes ubicaciones, para facilitar la función y utilidad del recubrimiento. Adicionalmente, pueden aplicarse capas que no contienen agentes terapéuticos o bioactivos. Tales capas "vacías", denominadas algunas veces "capas de barrera", son útiles en el control de la liberación de los agentes cargados. En ciertas realizaciones, puede ser deseable recubrir el sustrato con una capa "vacía" de fibroína de seda antes de recubrir con una capa "cargada".

50 En una realización, el recubrimiento de fibroína de seda estratificado comprende un agente terapéutico. La disolución de fibroína de seda puede ponerse en contacto con un agente terapéutico antes de la formación de la capa de fibroína deshidratada o puede cargarse sobre la capa deshidratada después de que se forme. En una realización preferida, el agente terapéutico se atrapa en la seda tras el secado de la capa de fibroína acuosa con una corriente de gas, por ejemplo, la deshidratación de las capas de fibroína de seda con gas  $\text{N}_2$  induce un cambio de conformación de la fibroína a la estructura de lámina beta, que atrapa al agente. Entonces pueden añadirse capas adicionales o bien con el mismo agente, un agente diferente o bien sin agente. Este enfoque de deposición progresiva permite también el atrapamiento de concentraciones variadas de agentes terapéuticos dentro de cada capa.

60 La variedad de diferentes agentes terapéuticos que puede usarse conjuntamente con los biomateriales de la presente invención es vasta e incluye moléculas pequeñas, proteínas, péptidos y ácidos nucleicos. En general, los agentes terapéuticos que pueden administrarse por medio de la invención incluyen, sin limitación: agentes antiinfecciosos tales como antibióticos y agentes antivirales; vectores virales, agentes quimioterápicos (es decir, agentes anticancerígenos); agentes antirechazo; analgésicos y combinaciones de analgésicos; agentes antiinflamatorios; hormonas tales como esteroides; factores de crecimiento (proteínas morfogénicas óseas (es decir, BMP 1-7), proteínas similares a las morfogénicas óseas (es decir, GFD-5, GFD-7 y GFD-8), factor de crecimiento  
65

epidérmico (EGF), factor de crecimiento de fibroblastos (es decir, FGF 1-9), factor de crecimiento derivado de las plaquetas (PDGF), factor de crecimiento similar a la insulina (IGF-I y IGF-II), factores de crecimiento transformante (es decir, TGF- $\beta$ -III), factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF)); factores de crecimiento nerviosos, proteínas antiangiogénicas tales como endostatina, y otras proteínas, polisacáridos, glicoproteínas o lipoproteínas modificadas por ingeniería genética o derivadas de manera natural. Se describen factores de crecimiento en The Cellular and Molecular Basis of Bone Formation and Repair por Vicki Rosen y R. Scott Thies, publicado por R. G. Landes Company, incorporado por el presente documento en el presente documento como referencia.

Adicionalmente, los biomateriales de seda de la presente invención pueden usarse para administrar cualquier tipo de compuesto molecular, tales como, materiales farmacológicos, vitaminas, sedantes, esteroides, hipnóticos, antibióticos, agentes quimioterápicos, prostaglandinas, metales, pigmentos o colorantes, y agentes radiofarmacéuticos. El sistema de administración de la presente invención es adecuado para la administración de los materiales anteriores y otros incluyendo pero sin limitarse a proteínas, péptidos, nucleótidos, hidratos de carbono, azúcares simples, células, genes, antitrombóticos, agentes antimetabólicos, inhibidor de factor de crecimiento, promotores del crecimiento, anticoagulantes, antimitóticos, fibrinolíticos, esteroides antiinflamatorios y anticuerpos monoclonales.

Adicionalmente, la formulación farmacéutica de biomaterial de seda de la invención puede comprender también el uso de un ligando de direccionamiento. Ligando de direccionamiento se refiere a cualquier material o sustancia que puede promover el direccionamiento de la formulación farmacéutica a tejidos y/o receptores *in vivo* y/o *in vitro* con las formulaciones de la presente invención. El ligando de direccionamiento puede ser sintético, semisintético o producirse de manera natural. Los materiales o sustancias que pueden servir como ligandos de direccionamiento incluyen, por ejemplo, proteínas, incluyendo anticuerpos, fragmentos de anticuerpos, hormonas, análogos de hormonas, glicoproteínas y lectinas, péptidos, polipéptidos, aminoácidos, azúcares, sacáridos, incluyendo monosacáridos y polisacáridos, hidratos de carbono, vitaminas, esteroides, análogos de esteroides, hormonas, cofactores, y material genético, incluyendo nucleósidos, nucleótidos, constructos de ácidos de nucleótidos, ácidos nucleicos peptídicos (PNA), aptámeros y polinucleótidos. Otros ligandos de direccionamiento en la presente invención incluyen moléculas de adhesión celular (CAM), entre las que están, por ejemplo, citocinas, integrinas, cadherinas, inmunoglobulinas y selectina. Las formulaciones farmacéuticas de la presente invención pueden abarcar también ligandos de direccionamiento precursores. Un precursor de un ligando de direccionamiento se refiere a cualquier material o sustancia que puede convertirse en un ligando de direccionamiento. Tal conversión puede implicar, por ejemplo, el anclaje de un precursor a un ligando de direccionamiento. Los restos de precursores de direccionamiento a modo de ejemplo incluyen grupos maleimida, grupos disulfuro, tales como disulfuro de ortopiridilo, grupos vinilsulfona, grupos azida y grupos yodoacetilo.

En una realización, los métodos de la invención se usan para recubrir un dispositivo médico implantable que experimenta flexión o expansión en el transcurso de su implantación o uso *in vivo*. Las palabras "flexión" y "expansión" tal como se usan en el presente documento con respecto a dispositivos implantables se referirán a un dispositivo, o parte del mismo, que se dobla (por ejemplo, en al menos 45 grados o más) y/o se expande (por ejemplo, hasta más de dos veces su dimensión inicial), o bien en el transcurso de su colocación, o bien después de eso en el transcurso de su uso *in vivo*. Cualquier dispositivo biomédico puede recubrirse usando los métodos de la invención.

El sustrato usado para el recubrimiento también puede ser un catéter. Los ejemplos de catéteres adecuados incluyen catéteres urinarios, que se beneficiarían de la incorporación de agentes antimicrobianos (por ejemplo, antibióticos tales como vancomicina o norfloxacino) en un recubrimiento de superficie, y catéteres intravenosos que se beneficiarían de agentes antimicrobianos y o de agentes antitrombóticos (por ejemplo, heparina, hirudina, cumadina). Tales catéteres se fabrican normalmente a partir de materiales tales como caucho de silicona, poliuretano, látex y poli(cloruro de vinilo).

Los métodos de la invención también pueden usarse para recubrir endoprótesis, por ejemplo, o bien endoprótesis autoexpansibles (tales como la variedad Wallstent), o endoprótesis expansibles con balón (tal como están disponibles en una variedad de estilos, por ejemplo, Gianturo-Roubin, Palmaz-Shatz, Wiktor, Strecker, ACS Multi-Link, Cordis, AVE Micro Stent), que se preparan normalmente a partir de materiales tales como acero inoxidable o tantalio.

La idoneidad de la composición de recubrimiento de fibroína para su uso en un material particular, y a su vez, la idoneidad de la composición recubierta pueden evaluarse por los expertos en la técnica, dada la presente descripción.

Pueden formularse biomateriales de seda que contienen agentes farmacológicos mezclando uno o más agentes terapéuticos con la disolución acuosa que se usa para preparar el recubrimiento de biomaterial estratificado. Alternativamente, puede cargarse un agente terapéutico sobre un recubrimiento estratificado preformado, preferiblemente con un portador farmacéuticamente aceptable. Puede usarse cualquier portador farmacéutico que no disuelva el material de seda. Los agentes terapéuticos pueden estar presentes como un líquido, un sólido finamente dividido o cualquier otra forma física apropiada.

En una realización, el recubrimiento de fibroína de seda estratificado de la invención comprende compuestos biológicamente activos que no son agentes terapéuticos. Por ejemplo, compuestos que funcionalizan el recubrimiento, tal como para hacer que el recubrimiento sea resistente a las bacterias (un recubrimiento antibacteriano), o que funcionan en la unión, por ejemplo, que ayudan en la unión de células a un armazón recubierto. Los ejemplos de compuestos biológicamente activos incluyen, pero sin limitarse a, mediadores de la unión celular, tales como colágeno, elastina, fibronectina, vitronectina, laminina, proteoglicanos o péptidos que contienen dominios de unión a integrina conocidos, por ejemplo, la secuencia de unión a integrina "RGD", o variaciones de la misma, que se sabe que afectan a la unión celular (Schaffner P y Dard, 2003, Cell Mol Life Sci. Jan; 60(1):119-32; Hersel U. *et al.* 2003 Biomaterials Nov; 24(24):4385-415); ligandos biológicamente activos; y sustancias que potencian o excluyen variedades particulares de crecimiento hacia el interior tisular o celular. Por ejemplo, las etapas de repoblación celular de una matriz de armazón tridimensional se realizan preferiblemente en presencia de factores de crecimiento eficaces para promover la proliferación de las células cultivadas empleadas para repoblar la matriz. Los agentes que promueven la proliferación dependerán del tipo de célula empleado. Por ejemplo, cuando se emplean células de fibroblastos, un factor de crecimiento para su uso en el presente documento puede ser el factor de crecimiento de fibroblastos (FGF), lo más preferiblemente el factor de crecimiento de fibroblastos básico (bFGF) (bFGF recombinante humano, UPSTATE Biotechnology, Inc.). Otros ejemplos de agentes aditivos que potencian la proliferación o diferenciación incluyen, pero sin limitarse a, sustancias osteoinductoras, tales como proteínas morfogénicas óseas (BMP); citocinas, factores de crecimiento tales como factor de crecimiento epidérmico (EGF), factor de crecimiento derivado de las plaquetas (PDGF), factor de crecimiento similar a la insulina (IGF-I y II) TGF- $\beta$  y similares. Tal como se usa en el presente documento, la expresión materiales biológicamente activos también abarca anticuerpos, ADN, ARN, materiales compuestos de ARN/proteína modificados, glucógenos u otros azúcares, y alcoholes.

Por tanto, los agentes bioactivos adecuados para su uso en los métodos de la invención incluyen cualquier sustancia que pueda ejercer un efecto profiláctico o terapéutico así como agentes que tienen efectos farmacológicos positivos sobre la expresión de la matriz extracelular. El agente bioactivo también puede ser para potenciar la cicatrización de heridas (por ejemplo en un sitio vascular) y mejorar las propiedades estructurales y elásticas en el sitio de administración (por ejemplo sitio vascular). Los ejemplos de tales principios activos incluyen sustancias antiproliferativas así como antineoplásicas, antiinflamatorias, antiplaquetarias, anticoagulantes, antifibrina, antitrombina, antimitóticas, antibióticas, antioxidantes y combinaciones de las mismas. Un ejemplo adecuado de una sustancia antiproliferativa incluye actinomicina D, o derivados y análogos de la misma (fabricada por Sigma-Aldrich 1001 West Saint Paul Avenue, Milwaukee, Wis. 53233; o COSMEGEN disponible de Merck). Los sinónimos de actinomicina D incluyen dactinomicina, actinomicina IV, actinomicina I1, actinomicina X1 y actinomicina C1. Los ejemplos de antineoplásicos adecuados incluyen paclitaxel (por ejemplo TAXOL® de Bristol-Myers Squibb Co., Stamford, Conn.), docetaxel (por ejemplo Taxotere®, de Aventis S. A., Frankfurt, Alemania) metotrexato, azatioprina, vincristina, vinblastina, fluorouracilo, clorhidrato de doxorubicina (por ejemplo Adriamycin® de Pharmacia & Upjohn, Peapack N.J.), mitomicina (por ejemplo Mutamycin® de Bristol-Myers Squibb Co., Stamford, Conn.) y docetaxel. Los ejemplos de antiplaquetarios, anticoagulantes, antifibrinas y antitrombinas incluyen heparina, heparina sódica, heparina de bajo peso molecular, sulfato de heparina, heparina que tiene un contraión hidrófobo, hirudina, argatrobán, forskolina, vapirost, prostaciclina y análogos de prostaciclina, dextrano, D-phe-pro-arg-clorometilcetona (antitrombina sintética), dipiridamol, antagonista de receptores de membrana de plaquetas de glicoproteína IIb/IIIa, hirudina recombinante, inhibidor de trombina (disponible de Biogen) y 7E-3B® (un fármaco antiplaquetario de Centocore). Los ejemplos de agentes antimitóticos adecuados incluyen metotrexato, azatioprina, vincristina, vinblastina, fluorouracilo, adriamicina y mutamicina. Los agentes antiproliferativos o citostáticos adecuados incluyen angiopeptina (un análogo de somatostatina de Ibsen), inhibidores de la enzima convertidora de angiotensina tales como CAPTOPRIL (disponible de Squibb), CILAZAPRIL (disponible de Hoffman-LaRoche) o LISINOPRIL (disponible de Merck); bloqueantes de canales de calcio (tales como nifedipino), colchicina, antagonistas del factor de crecimiento de fibroblastos (FGF), aceite de pescado (ácido graso omega 3), antagonista de histamina, LOVASTATINA (un inhibidor de HMGCoA reductasa, un fármaco hipocolesterolemiante de Merck), anticuerpos monoclonales (tales como receptores de PDGF), nitroprusiato, inhibidores de fosfodiesterasa, inhibidor de prostaglandina (disponible de Glazo), Seramin (un antagonista de PDGF), bloqueantes de serotonina, esteroides, inhibidores de tioproteasa, triazolopirimidina (un antagonista de PDGF) y óxido nítrico. Otros agentes o sustancias terapéuticas que pueden ser apropiadas incluyen manosa-6-fosfato, superóxido dismutasa, ácido retinoico, suramina, asiaticósido, hialuronano, interferón alfa, células epiteliales genéticamente modificadas, dexametasona y rapamicina y derivados estructurales o análogos funcionales de la misma, tales como 40-O-(2-hidroxi)etil-rapamicina (conocida con el nombre comercial de EVEROLIMUS disponible de Novartis), 40-O-(3-hidroxi)propil-rapamicina, 40-O-[2-(2-hidroxi)etoxi]etil-rapamicina y 40-O-tetrazol-rapamicina. No se permite que la exposición de la disolución de fibroína al principio activo altere de manera adversa la característica o composición del principio activo. Por consiguiente, el agente bioactivo particular se selecciona para lograr una compatibilidad mutua con la composición combinada.

La dosificación o concentración del agente bioactivo requerida para producir un efecto terapéutico deseable debe ser menor que el nivel al que el principio activo produce efectos tóxicos y mayor que el nivel al que se obtienen resultados no terapéuticos. Por ejemplo, la dosificación o concentración del principio activo requerida para inhibir la actividad celular deseada puede depender de factores tales como las circunstancias particulares del paciente; la



- 5 naturaleza del traumatismo; la naturaleza de la terapia deseada; el tiempo a lo largo del cual el principio administrado reside en el sitio de tratamiento; y si se emplean otras sustancias bioactivas, la naturaleza y el tipo de la sustancia o combinación de sustancias. Pueden determinarse dosificaciones terapéuticas eficaces empíricamente, por ejemplo, en el caso de una endoprótesis vascular, mediante la infusión de vasos de sistemas modelo animales adecuados y usando métodos de inmunohistoquímica, microscopía fluorescente o electrónica para detectar el agente y sus efectos o realizando estudios *in vitro* adecuados. Un experto habitual en la técnica comprende procedimientos de prueba farmacológicos convencionales para determinar las dosificaciones.
- 10 También pueden añadirse polímeros biocompatibles a la disolución de seda para generar matrices compuestas en el procedimiento de la presente invención. Los polímeros biocompatibles útiles en la presente invención incluyen, por ejemplo, poli(óxido de etileno) (PEO) (documento US 6.302.848), polietilenglicol (PEG) (documento US 6.395.734), colágeno (documento US 6.127.143), fibronectina (documento US 5.263.992), queratina (documento US 6.379.690), poli(ácido aspártico) (documento US 5.015.476), polilisina (documento US 4.806.355), alginato (documento US 6.372.244), quitosano (documento US 6.310.188), quitina (documento US 5.093.489), ácido hialurónico (documento US 387.413), pectina (documento US 6.325.810), policaprolactona (documento US 6.337.198), poli(ácido láctico) (documento US 6.267.776), poli(ácido glicólico) (documento US 5.576.881), polihidroxialcanoatos (documento US 6.245.537), dextranos (documento US 5.902.800) y polianhídridos (documento US 5.270.419). Pueden usarse dos o más polímeros biocompatibles.
- 20 Cuando el biomaterial de fibroína de seda se usa para administrar agentes terapéuticos, o se usa en otras aplicaciones biomédicas, preferiblemente, el recubrimiento estratificado es biodegradable.
- 25 La tasa de degradación del recubrimiento biodegradable puede controlarse ajustando el grado en que cada capa se deshidrata y/o ajustando el grosor de cada capa. El grosor de cada capa depositada puede controlarse ajustando una variedad de parámetros, incluyendo el ajuste de la concentración de sal, la concentración de fibroína y el pH de la disolución de fibroína de seda acuosa usada para formar la capa y el medio de enjuagado (agua y metanol). El nivel de sequedad/deshidratación puede ajustarse ajustando la cantidad de tiempo que se expone la capa al gas de deshidratación.
- 30 En una realización, la concentración de sal se aumenta para favorecer la deposición de fibroína de seda sobre el sustrato. La concentración de sal puede aumentarse mediante la adición de cualquier sal a la disolución de fibroína de seda acuosa incluyendo, pero sin limitarse a, sales monovalentes y divalentes tales como NaCl, KCl y CaCl<sub>2</sub>. Sales preferidas son monovalentes, tal como NaCl y KCl.
- 35 En una realización preferida, la concentración de sal se ajusta usando NaCl. Cuando se deposita fibroína sobre un sustrato hidrófobo, el aumento de la concentración de sal aumenta la cantidad de fibroína depositada sobre el sustrato dando como resultado una estructura más compacta de cadenas de fibroína.
- 40 El grosor de cada capa depositada también puede controlarse ajustando la concentración de fibroína en la disolución de fibroína de seda usada para formar la capa. Cuanto más concentrada esté la fibroína en la disolución de fibroína de seda acuosa, más fibroína se deposita sobre el sustrato y se forma una estructura más compacta.
- 45 El ajuste del pH de la disolución de fibroína de seda acuosa también afecta a la cantidad de fibroína depositada sobre el sustrato. Cuando el sustrato es un sustrato cargado negativamente, la reducción del pH de la disolución de fibroína de seda favorece la deposición de la fibroína de seda sobre el sustrato. Cuando el sustrato es un sustrato cargado positivamente, el aumento del pH de la disolución de fibroína de seda favorece la deposición de la fibroína de seda sobre el sustrato. A un pH bajo (por ejemplo 2,0) las cadenas de fibroína de seda tienen una carga neta positiva, que favorece la deposición sobre un sustrato negativo. En cambio, a un pH alto (por ejemplo 12,5) las cadenas de fibroína de seda tienen una carga neta negativa y, por tanto, no se favorece la deposición sobre un sustrato cargado negativamente.
- 50 En una realización preferida, se usan los métodos de la invención para generar capas ultrafinas de material de fibroína de seda de aproximadamente 1 a aproximadamente 12 nanómetros de grosor.
- 55 La disolución de fibroína de seda puede recubrirse sobre cualquier sustrato. El sustrato puede ser de una naturaleza sintética o natural. Por ejemplo, el sustrato puede estar hecho de plástico, madera, vidrio, cuero, tela, fibras sintéticas o cualquier metal o aleación.
- 60 Además, el sustrato puede ser de cualquier tamaño o forma. Diversos artículos conformados incluyendo dispositivos biomédicos (por ejemplo endoprótesis), biomateriales, biosensores y armazones de ingeniería de tejidos pueden estratificarse fácilmente con fibroína de seda usando los métodos de la invención.
- 65 Los recubrimientos de biomateriales producidos usando los métodos de la presente invención pueden usarse en una variedad de aplicaciones médicas tales como un dispositivo de administración de fármacos (por ejemplo, molécula pequeña, proteína o ácido nucleico), incluyendo sistemas de liberación controlada, sistemas de cierre de heridas, incluyendo dispositivos de reparación de heridas vasculares, vendajes hemostáticos, parches y pegamentos,

suturas, y en aplicaciones de ingeniería de tejidos, tales como, por ejemplo, armazones para regeneración tisular, dispositivos protésicos de ligamentos y en productos para implantación a largo plazo o biodegradable en el cuerpo humano. También pueden usarse películas estratificadas para una amplia gama de necesidades de la ingeniería y ciencia de materiales, o como materiales independientes.

5 En los métodos de la invención, puede prepararse un sistema de administración de fármacos a base de seda estratificado que comprende una pluralidad de capas de fibroína de seda. La fibroína de seda en cada capa puede diferir en conformación o en concentraciones, y cada capa puede ser de diferente grosor y contener los mismos o diferentes fármacos. Pueden combinarse diferentes capas en diversas secuencias para crear estructuras "similares a una cebolla" de manera que el vehículo de administración ofrecerá tasas cambiantes de liberación de cada capa dependiendo de la cristalinidad, el grosor, la concentración del fármaco o el tipo de fármaco, etc. Este enfoque es muy susceptible al aumento a escala y combinatoria con respecto a enfoques relacionados y formulación para crear múltiples puntos de control en perfiles de liberación y combinaciones de fármacos.

10 15 La liberación controlada permite que se administren dosificaciones a lo largo del tiempo, con cinética de liberación controlada. En algunos casos, la administración del agente terapéutico es continua en el sitio en el que se necesita tratamiento, por ejemplo, a lo largo de varias semanas. La liberación controlada a lo largo del tiempo, por ejemplo, a lo largo de varios días o semanas, o más, permite la administración continua del agente terapéutico para obtener un tratamiento óptimo. El vehículo de administración controlada es ventajoso porque protege al agente terapéutico de la degradación *in vivo* en tejido y fluidos corporales, por ejemplo, por proteasas.

20 La liberación controlada de la formulación farmacéutica puede diseñarse para que se produzca a lo largo del tiempo, por ejemplo, durante más de aproximadamente 12 ó 24 horas. El tiempo de liberación puede seleccionarse, por ejemplo, para que se produzca a lo largo de un periodo de tiempo de aproximadamente 12 horas a 24 horas; de aproximadamente 12 horas a 42 horas; o, por ejemplo, de aproximadamente 12 a 72 horas. En otra realización, la liberación puede producirse por ejemplo en el orden de aproximadamente 2 a 90 días, por ejemplo, de aproximadamente 3 a 60 días. En una realización, el agente terapéutico se administra localmente a lo largo de un periodo de tiempo de aproximadamente 7-21 días, o de aproximadamente 3 a 10 días. En otros casos, el agente terapéutico se administra a lo largo de 1, 2, 3 o más semanas en una dosificación controlada. El tiempo de liberación controlada puede seleccionarse basándose en el estado tratado. Por ejemplo, tiempos más largos pueden ser más eficaces para la cicatrización de heridas, mientras que tiempos de administración más cortos pueden ser útiles para algunas aplicaciones cardiovasculares.

25 30 La liberación controlada del agente terapéutico a partir del artículo de fibroína puede producirse *in vivo*, por ejemplo, en la cantidad de aproximadamente 1 ng a 1 mg/día, por ejemplo, de aproximadamente 50 ng a 500 pg/día, o, en una realización, de aproximadamente 100 ng/día. Pueden formularse sistemas de administración que comprenden agente terapéutico y un portador que incluyen, por ejemplo, de 10 ng a 1 mg de agente terapéutico, o en otra realización, de aproximadamente 1 ug a 500 ug, o, por ejemplo, de aproximadamente 10 ug a 100 ug, dependiendo de la aplicación terapéutica.

35 40 El biomaterial farmacéutico puede administrarse mediante una variedad de vías conocidas en la técnica incluyendo tópica, oral, parenteral (incluyendo inyección intravenosa, intraperitoneal, intramuscular y subcutánea así como administración intranasal o por inhalación) e implantación. La administración puede ser sistémica, regional o local. Adicionalmente, la administración puede ser intratecal, por ejemplo, para administración al SNC.

45 50 La administración de la formulación farmacéutica para el tratamiento de heridas puede ser mediante aplicación tópica, administración sistémica por las vías parenteral o enteral, o implantación o inyección regional o local. El vehículo a base de seda puede formularse en formas apropiadas para diferentes vías de administración tal como se describe en la técnica, por ejemplo, en "Remington: The Science and Practice of Pharmacy", Mack Publishing Company, Pensilvania, 1995, cuya descripción se incorpora en el presente documento como referencia.

55 El vehículo de liberación controlada puede incluir excipientes disponibles en la técnica, tales como diluyentes, disolventes, tampones, solubilizantes, agentes de suspensión, agentes de control de la viscosidad, aglutinantes, lubricantes, tensioactivos, conservantes y estabilizantes. Las formulaciones pueden incluir agentes de carga, agentes quelantes y antioxidantes. Cuando se usan formulaciones parenterales, la formulación puede incluir adicional o alternativamente azúcares, aminoácidos o electrolitos.

60 65 Los excipientes incluyen polioles, por ejemplo, de un peso molecular inferior a aproximadamente 70.000 kD, tal como trehalosa, manitol y polietilenglicol. Véase por ejemplo la patente estadounidense n.º 5.589.167, cuya descripción se incorpora en el presente documento. Los tensioactivos a modo de ejemplo incluyen tensioactivos no iónicos, tales como tensioactivos Tweeng, polisorbatos, tales como polisorbato 20 u 80, etc., y los poloxámeros, tales como poloxámero 184 o 188, polioles Pluronic (r), y otros polímeros de bloque de etileno/polipropileno, etc. Los tampones incluyen tampones Tris, citrato, succinato, acetato o histidina. Los conservantes incluyen fenol, alcohol bencílico, metacresol, metilparabeno, propilparabeno, cloruro de benzalconio y cloruro de bencetonio. Otros aditivos incluyen carboximetilcelulosa, dextrano y gelatina. Los agentes estabilizantes incluyen heparina, polisulfato de pentosán y otros heparinoides, y cationes divalentes tales como magnesio y zinc.

Todos los biomateriales de la presente invención pueden esterilizarse usando un procedimiento de esterilización convencional tal como esterilización basada en radiación (es decir, rayos gamma), esterilización a base de compuestos químicos (óxido de etileno), autoclavado u otros procedimientos apropiados. Preferiblemente, el procedimiento de esterilización será con óxido de etileno a una temperatura de entre 52 - 55° C durante un tiempo de 8 horas o menos. Tras la esterilización, los biomateriales pueden envasarse en un envase resistente a la humedad esterilizado apropiado para su transporte.

A menos que se defina lo contrario, todos los términos técnicos y científicos usados en el presente documento tienen el mismo significado que entiende comúnmente un experto habitual en la técnica. Aunque pueden usarse métodos y materiales similares o equivalentes a los descritos en el presente documento en la práctica o las pruebas de la invención, los métodos y materiales preferidos se describen a continuación. Además, los materiales, métodos y ejemplos son sólo ilustrativos y no pretenden ser limitativos. En caso de conflicto, prevalece la presente memoria descriptiva, incluyendo las definiciones.

La invención se caracterizará adicionalmente mediante los siguientes ejemplos que pretenden ser a modo de ejemplo de la invención.

## EJEMPLOS

### Ejemplo I

Construcción de recubrimientos delgados a nanoescala mediante deposición progresiva de seda

### Métodos

Materiales. M. Tsukada, Instituto de Sericultura, Tsukuba, Japón suministró amablemente capullos de seda del gusano de seda *B. mori*. El suero bovino fetal (FBS), medio esencial mínimo  $\alpha$  ( $\alpha$ MEM), factor de crecimiento de fibroblastos básico (bFGF), penicilina-estreptomicina (Pen-Strep), fungizona, aminoácidos no esenciales y tripsina eran de Gibco (Carlsbad, CA). El fosfato de ácido ascórbico, Histopaque-1077, dexametasona,  $\beta$ -glicerofosfato, Nonidet P-40 (NP-40), fluoruro de sodio (NaF), cóctel de inhibidores de proteasas y cóctel de inhibidores de fosfatasas se obtuvieron de Sigma (St. Louis, MO). Todas las otras sustancias eran de calidad analítica o farmacéutica y se adquirieron de Sigma y Aldrich y se usaron sin purificación adicional.

Se preparó una disolución madre acuosa de fibroína de seda tal como se describió anteriormente (Kim, U.-J.; Biomaterials, 2005, 26, 2775-2785). En resumen, se hirvieron capullos de *B. mori* durante 20 minutos en una disolución acuosa de  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  0,02 M, y entonces se enjuagaron meticulosamente con agua destilada para extraer la cera y las proteínas sericina similares a pegamento. Entonces, se disolvió la fibroína de seda extraída en disolución de LiBr 9,3 M a 60°C durante 4 horas, produciendo una disolución al 20 por ciento (peso/volumen). Se dializó esta disolución frente a agua destilada usando un casete de diálisis Slide-a-Lyzer (MWCO 3500, Pierce) durante 3 días para eliminar la sal. Se centrifugó la disolución resultante para eliminar impurezas y los agregados que se produjeron durante la diálisis. La concentración final de la disolución acuosa de fibroína de seda era de aproximadamente el 7,5 al 8 por ciento (p/v). Se determinó esta concentración pesando el sólido residual de un volumen de disolución conocido tras el secado.

Se prepararon disoluciones de seda para la inmersión diluyendo la disolución de seda madre con agua desionizada (DI) y se filtraron a través de un filtro de jeringa de membrana de 0,8  $\mu\text{m}$  antes de su uso. La concentración de la disolución de inmersión de fibroína variaba entre 0,1 y 2,0 mg/ml. Se prepararon disoluciones usadas para evaluar los efectos del pH o la concentración de NaCl sobre la formación de película usando agua DI previamente ajustada al pH deseado y a las concentraciones de sal usando ácido clorhídrico e hidróxido de sodio. El pH y la concentración de NaCl variaban entre 2,0 y 12,5 y 0 y 1,0 M, respectivamente.

Se usaron diferentes sustratos para la deposición de película dependiendo de la caracterización secuencial. Los portaobjetos de microscopio de cuarzo para mediciones de espectroscopía UV-vis eran de Quartz Scientific, Inc. (Fairport Harbor, OH), los portaobjetos de microscopio de vidrio para cultivo celular eran de VWR Scientific (Bridgeport, NJ), los portaobjetos de mica para las mediciones de microscopio de fuerza atómica (AFM) eran de Ted Pella, Inc. (Redding, CA) y los cristales de cuarzo con electrodos de oro evaporado para las mediciones de microbalanza de cristal de cuarzo para investigación (RQCM) eran de Maxtek, Inc. (Cypress, CA). Se limpiaron todos los sustratos durante 2 h en disolución de Chemsol al 1% de Mallinckrodt Chemicals (Phillipsburg, NJ) y se enjuagaron meticulosamente con agua desionizada. Se usó agua desionizada (18 M $\Omega$ cm) en todas las etapas de lavado para preparar disoluciones de fibroína de seda.

Deposición y caracterización del recubrimiento de fibroína de seda. El procedimiento de deposición de fibroína de seda se llevó a cabo tal como sigue: se sumergió el sustrato limpiado en disolución de inmersión de seda durante 2 minutos a temperatura ambiente y posteriormente se lavó con agua desionizada o metanol/agua (razón 1:1) durante 1 minuto. Tras las etapas de deposición y lavado, se deshidrató el sustrato con un flujo suave de gas nitrógeno

durante 2 minutos. Se repitió este procedimiento hasta que se ensambló el número de capas deseado.

Se monitorizó la acumulación de las múltiples capas en cada deposición mediante un espectrofotómetro GBC UV/VIS 916 y una microbalanza de cristal de cuarzo para investigación (RQCM) (Maxtek Inc.). Se determinó el grosor de recubrimiento mediante RQCM. Se caracterizaron la morfología de superficie de los recubrimientos preparados tal cual y los recubrimientos tratados con metanol mediante AFM (Veeco Metrology Group Santa Barbara, CA). Se estudió la conformación de la fibroína de seda mediante ATR-FTIR (Equinox 55; Bruker, Billerica, MA).

Cultivo celular. Se prepararon células madre de médula ósea humana P2 (hMSC) ( $5 \times 10^5$  células/portaobjetos) tal como se ha notificado anteriormente (Meinel, L. *et al.* J Biomed Mater Res A, 2004, 71, 25-34; Meinel, L. Hofmann, *et al.* Biomaterials, 2005, 26, 147-155) y se sembraron sobre los portaobjetos recubiertos con fibroína de seda de 6 capas esterilizados con etanol (aproximadamente 40 nm de grosor) con el fin de evaluar la estabilidad fisiológica de los recubrimientos y la adhesión, crecimiento y diferenciación celular *in vitro*. Tras 24 horas, se retiró el medio de crecimiento y se mantuvieron los cultivos en pocillos individuales de placas de 6 pocillos. Los medios osteogénicos consistían en medio esencial mínimo  $\alpha$  ( $\alpha$ -MEM) complementado con un 10% de suero bovino fetal (FBS), aminoácidos no esenciales 0,1 mM, 2-fosfato de ácido ascórbico 50  $\mu$ g/ml, dexametasona 10 nM y  $\beta$ -glicerolfosfato 10 mM en presencia de penicilina 100 U/ml, estreptomycin 100 mg/ml y fungizona 0,25 mg/ml (véase Meinel *et al.* Biomaterials 2005, 26, 147-155 y Meinel *et al.* J. Biomed Mater Res A, 2004, 71, 25-34 para los detalles). Se mantuvieron los cultivos a 37°C en un incubador humidificado complementado con un 5% de CO<sub>2</sub>. Se cambió la mitad del medio cada 2-3 días. Se fijaron las muestras con etanol frío al 70% para evaluaciones histológicas y bioquímicas usando técnicas convencionales tales como tinción con hematoxilina y eosina, fosfatasa alcalina (ALP), y alizarina roja-S a los 1, 7, 14 y 21 días (véase Karageorgiou *et al.*, J. Biomedical Materials Res. 71A:528-537, 2005), Meinel *et al.* Biomaterials 2005, 26, 147-155 y Meinel *et al.* J. Biomed Mater Res A, 2004, 71, 25-34 para los detalles).

#### Resultados

Deposición capa a capa de fibroína de seda. Para monitorizar la deposición de fibroína de seda, se usaron espectroscopía UV-Vis y RQCM. Se muestra en la figura 1 espectros de absorción de UV-Vis para múltiples capas de seda sobre un sustrato de cuarzo preparadas mediante deposición repetitiva a partir de una disolución acuosa de fibroína de seda 1 mg/ml, seguido por enjuagado con agua DI y secado. Los procedimientos de adsorción de múltiples capas son lineales y reproducibles. La absorbancia a 228 nm para el carácter de doble enlace parcial de la proteína de seda aumentó linealmente con el número de capas, tal como se muestra en el diagrama de la figura 1. Esta linealidad confirma el crecimiento progresivo regular de las películas. De manera similar, la adsorción también avanzó linealmente mientras se enjuagaban las películas con metanol/agua (razón 1:1) en cada etapa pero con un aumento superior del 33% cuando se prepararon a partir de una disolución de seda 1,0 mg/ml (datos no mostrados). Se muestra en la figura 2 la comparación de absorbancia a 228 nm para películas de 12 capas preparadas a partir de cinco concentraciones de fibroína de seda diferentes y mediante los dos métodos de enjuagado diferentes. En cada concentración, la absorbancia de las películas preparadas enjuagando con metanol/agua era significativamente superior que las preparadas enjuagando con agua DI. Esta deposición superior se debía a la formación de estructura de lámina  $\beta$  mediada por el impacto de deshidratación del metanol que estabilizó las películas mediante bloqueo en esta estructura de lámina beta cristalina. Esta transición estructural inducida por el metanol se usa comúnmente para estabilizar la fibroína de seda en diversas formas incluyendo películas (Jin, H.-J.; Park, Karageorgiou, V; Kim, U. J.; Valluzzi, R.; Cebe, P.; Kaplan, D. L. Adv. Funct. Mater., 2005, 15, 1-7; Jin, H.-.; Fridrikh, S. V.; Rutledge, G. C.; Kaplan, D. L. Biomacromolecules, 2002, 3, 1233-1239; Nazarov, R.; Jin, H.-J.; Kaplan, D. L. Biomacromolecules, 2004, 5, 718-726). En cambio, el enjuagado de las películas acuosas depositadas sin metanol dio como resultado desorción parcial de las moléculas de fibroína de seda, dando como resultado valores de deposición inferiores.

La microbalanza de cristal de cuarzo (QCM) es un dispositivo de medición extremadamente sensible que puede identificar cambios de masa en el intervalo de nanogramo/cm<sup>2</sup> con un amplio intervalo dinámico que se extiende en el intervalo de 100  $\mu$ g/cm<sup>2</sup> en las superficies de contacto sólido-líquido o sólido-aire. La técnica de QCM se basa en la tendencia de un cristal piezoeléctrico para cambiar su frecuencia de oscilación natural cuando tiene lugar una deposición o disminución de masa adicional sobre los electrodos del cristal. Se sumergió el resonador de QCM durante un periodo de tiempo fijado en una disolución de seda y se secó bajo una corriente de nitrógeno. Tras secar, se midieron los cambios de frecuencia. Se llevaron a cabo todos los experimentos en una sala con aire acondicionado a aproximadamente 20°C. La relación teórica (ecuación de Sauerbrey) entre el cambio de masa por área unitaria en la superficie del electrodo QCM y el cambio observado en la frecuencia de oscilación del cristal se obtiene teniendo en cuenta las características de los resonadores de cuarzo usados.

$$\Delta f = -C_f \times \Delta m$$

en la que:

$\Delta f$  = el cambio de frecuencia observado en Hz,

Cf = el factor de sensibilidad del cristal en Hz/ng/cm<sup>2</sup>

(0,081 Hz/ng/cm<sup>2</sup> para un cristal de 6 MHz a 20°C)

Δm = el cambio en masa por área unitaria, en g/cm<sup>2</sup>

A partir de esta ecuación, se identificó la masa adsorbida sobre el cristal. El grosor de la película depositada puede obtenerse fácilmente suponiendo una cierta uniformidad de superficie del electrodo de oro (sobre el cuarzo) y la película depositada. Se usó un valor de densidad de 1,30 g/cm<sup>3</sup> para las películas de seda (He, S.-J.; Valluzzi, R.; Gido, S. P. *International Journal de Biological Macromolecules* 1999, 24, 187-195).

Se muestran en la figura 3 los cambios de frecuencia tras la formación de la película como una función del número de capas depositadas y la concentración de la sal añadida. La adsorción sucesiva de la fibroína de seda indicó una tendencia generalmente lineal hacia una disminución de la frecuencia (signo negativo) a medida que aumentaba el número de capas. A medida que aumentaba la concentración de cloruro de sodio (NaCl), el cambio de frecuencia y la tasa de adsorción aumentaban. El procedimiento de adsorción era generalmente estable y reproducible en todos los casos.

Históricamente, se considera que la fuerza impulsora principal o interacción de estabilización principal en el ensamblaje de película capa a capa alternas son interacciones electrostáticas entre especies cargadas de manera opuesta (Decher, G. *Science*, 1997, 277, 1232-1237) Sin embargo, también se han reconocido otras interacciones tales como interacciones ión-dipolo o dipolo-dipolo, el efecto hidrófobo, puentes de hidrógeno o factores entrópicos relacionados con cambios conformacionales inducidos por la superficie (Hammond, P. T. *Curr. Opin. Colloid Interface Sci.* 2000, 4, 430-442; Fisher, P.; Laschewsky, A. *Macromolecules*, 2000, 33, 1100-1102; Shimazaki, Y.; Mitsuishi, M.; Ito, S.; Yamamoto, M. *Langmuir*, 1998, 14, 2768-2773; Stockton, W. B.; Rubner, M. F. *Macromolecules*, 1997, 30, 2717-2725).

El proceso de adsorción real es más complicado cuando participan proteínas. Datos experimentales recientes han mostrado que múltiples capas de polielectrolitos pueden interactuar fuertemente con proteínas independientemente de la polaridad de la carga en o bien las múltiples capas o bien la proteína (Ladam, G. *et al.* *Langmuir*, 2001, 17, 878-882). Johnston *et al.* demostraron recientemente la acumulación de películas de múltiples capas y cápsulas huecas que consisten únicamente en ADN usando puentes de hidrógeno de las pares de bases (Johnston, A. P. R. *et al.* *Nano lett.* 2005, 5, 953-956) Serizawa *et al.* notificaron la fabricación de películas de colágeno ultrafinas sobre el electrodo de oro de una microbalanza de cristal de cuarzo mediante la repetición de procedimientos de adsorción a partir de una disolución acuosa que contiene sal y posterior secado (Lojou, E. *et al.* *Langmuir*, 2003, 20, 748-755). Se creía que los procedimientos incluían adsorción física no específica mediante el efecto hidrófobo y la posterior estabilización en aire mediante las interacciones inter y/o intramoleculares fuertes.

Se han aprovechado las interacciones hidrófobas fuertes características de la fibroína de seda como la base para la estabilización de la película mediante las técnicas descritas en el presente trabajo. La fibroína de seda del gusano de seda de *B. mori* consiste principalmente en repeticiones de glicina y alanina que dominan la estructura. La cadena de fibroína consiste en dos secuencias polipeptídicas básicas, polipéptidos cristalinos y menos ordenados que se alternan regularmente. La secuencia básica de los polipéptidos "cristalinos" es de -(Ala-Gly)<sub>n</sub>- que adopta una estructura de lámina β, mientras que los polipéptidos "menos ordenados" contienen aminoácidos adicionales, en particular, tirosina, valina y aminoácidos ácidos así como básicos (Bini *et al.*, *J Mol Biol.*, 2004, 335, 27-40). Para disoluciones diluidas de fibroína de seda regenerada, en ausencia de sal, las cadenas de fibroína están presentes como moléculas individuales y sus agregados-8073) (Hossain, K. S.; Ohyama, E.; Ochi, A.; Magoshi, J.; Nemoto, N. *J. Phys. Chem. B*, 2003, 107, 8066).

La adición de sal conduce a una estructura más compacta de las cadena de fibroína que resulta de las interacciones hidrófobas entre residuos no polares que surgen del efecto de precipitación con sales (Robinson, D. R.; Jencks, W. P. *J. Am. Chem. Soc.* 1965, 87, 2470-2479). En un sistema de fibroína de seda, la fuerza impulsora de la deposición de las cadenas de proteína de fibroína de seda sobre un sustrato sólido se atribuye a interacciones hidrófobas así como interacciones electrostáticas parciales. Esta hipótesis propuesta está apoyada por las siguientes observaciones. El grosor de las capas depositadas aumentó en tanto como el 43% cuando la concentración de sal se aumentó desde 0 hasta 1,0 M. Mientras que con el uso de un sustrato de cuarzo tratado con hexametildisilazano que produjo una superficie hidrófoba, la deposición era el 28% superior que sobre un sustrato de cuarzo no tratado en condición neutra. Los motivos para esto no se entienden completamente pero se cree que se debe a una disminución de la barrera de energía que resiste a la adsorción con baja capacidad de retención de agua de las superficies hidrófobas (cambios en la hidratación hidrófoba) e interacciones entre dominios de proteína hidrófobos internos y la superficie hidrófoba, que conducen a un aumento de la entropía interna de la proteína. Por otro lado, la deposición se vio afectada por el pH de la disolución cuando se usó un sustrato cargado. A medida que aumentaba el pH de la disolución desde pH 2 hasta pH 12,5, la deposición sobre un sustrato cargado negativamente disminuía. Esto es porque a pH bajo (2,0), las cadenas de fibroína de seda tienen una carga neta positiva, que favorece un sustrato negativo. Por tanto, interacciones tanto hidrófobas como electrostáticas contribuían a la deposición, dando

como resultado una deposición superior. En cambio, a pH alto (12,5), las cadenas de fibroína de seda tienen carga neta negativa y, por tanto, no se favorece un sustrato cargado negativamente. La deposición se impulsaba principalmente debido a interacciones hidrófobas. Esto indicó que también participaban las interacciones electrostáticas en el procedimiento.

También se investigó el comportamiento de deposición de la fibroína de seda monitorizando la masa de deposición frente a la concentración de disolución de inmersión usando RQCM. La cantidad adsorbida de fibroína de seda aumentaba a medida que la concentración de polímero en la disolución de inmersión aumentaba, alcanzando un valor de meseta o saturación a 2 mg/ml en el que la cantidad adsorbida era independiente de la concentración de la disolución. También se observó un comportamiento de deposición similar con la investigación de los efectos de la sal.

La cinética de la adsorción de proteína a una superficie sólida consiste normalmente en una fase de deposición inicial muy rápida, seguida por una fase más lenta con la aproximación al valor de estado estacionario. Se muestra en la figura 4 un cambio de frecuencia *in situ* representativo (función del tiempo) para la adsorción de fibroína de seda sobre la superficie del electrodo de oro RQCM. La dependencia del tiempo de la frecuencia y el cambio de masa mostró una disminución inicial rápida en la frecuencia, seguida por un comportamiento menos brusco. Las mediciones hasta 25 minutos indican que en el plazo de 5 minutos tiene lugar casi el 85% de la adsorción (saturación). La deposición se saturó cuando se alcanzó el equilibrio. En comparación con mediciones *in situ* en medios acuosos, la linealidad del procedimiento de deposición medido "en aire" refleja la masa real depositada tras cada adsorción alterna. Esto significa que el procedimiento de deshidratación es necesario para el ensamblaje de películas progresivo. La película de fibroína de seda podría estabilizarse mediante sus interacciones inter y/o intramoleculares a partir de la eliminación del agua. Se redujo la energía superficial para ayudar a facilitar la deposición adicional. Se muestra en la figura 5 una representación esquemática del procedimiento de deposición. Sobre superficies hidrófobas, la fibroína de seda se deposita mediante adsorción física principalmente mediante interacciones hidrófobas, seguido por interacciones intra e intercatenarias entre los dominios hidrófobos en la superficie a medida que aumenta la concentración. Estas interacciones se inducen para formar estructuras de lámina  $\beta$  tras la deshidratación mediante secado con nitrógeno. La deposición es inferior sobre superficies hidrófilas, donde las interacciones hidrófobas inicialmente localizadas durante la adsorción se complementan con interacciones hidrófobas a medida que las concentraciones de cadenas aumentan en la superficie. La adición de sal a la disolución de fibroína de seda da como resultado una estructura más compacta de las cadenas de fibroína en disolución así como mayores interacciones hidrófobas intercatenarias, dando como resultado deposición superior que en ausencia de sal.

Estructura y morfología de superficie de películas finas. Se han propuesto varios modelos para la estructura secundaria de la fibroína de seda, incluyendo hélice aleatoria, hélice  $\alpha$ , seda I, seda II y seda III. La hélice aleatoria y la hélice alfa tienden a agruparse en seda I puesto que no pueden distinguirse mediante espectroscopía infrarroja (Asakura, T.; Kuzuhara, A.; Tabeta, R.; Saito, H. *Macromolecules*, 1985, 18, 1841-1845).

La seda II es una lámina  $\beta$  antiparalela en la que las cadenas polipeptídicas están alineadas y las cadenas adyacentes están conectadas con puentes de hidrógenos entre grupos carbonilo a amina. La seda I es una estructura menos concentrada que la seda II, pero habitualmente se considera sumamente metaestable y su estructura se convertirá en seda II (lámina  $\beta$ ) mediante tratamientos fisicoquímicos tales como la aplicación de fuerzas mecánicas (estiramiento, cizallamiento, enrollamiento, rotación o compresión), tratamiento térmico y mediante inmersión en disolventes orgánicos seleccionados tales como metanol (Nam, J.; Park, Y. H. *Journal of Applied Polymer Science*, 2001, 81, 3008-3021).

Se muestran en la figura 6 espectros de ATR-FTIR de recubrimientos de múltiples capas de fibroína de seda y tras el tratamiento con metanol. Se realizó la deconvolución de los espectros de amida I de fibroína usando software espectroscópico de Bruker (versión 4.2). Se evaluó la contribución de cada curva a la banda de amida I integrando el área bajo la curva y normalizando entonces hasta el área total bajo la región de banda de amida I ( $1.600-1.700\text{ cm}^{-1}$ ). La banda de amida I tanto para recubrimientos preparados tal cual como recubrimientos tratados con metanol mostró un pico fuerte a  $1622\text{ cm}^{-1}$ , que está en la región que es característica para frecuencias de estructuras  $\beta$  antiparalelas. El área atribuida a la adsorción a  $1622\text{ cm}^{-1}$  contribuía al 40% y al 47% para los recubrimientos preparados tal cual y los recubrimientos tratados con metanol, respectivamente. Merece la pena destacar que la estructura de seda II (lámina  $\beta$ ) se formaba incluso sin tratamiento con metanol. La formación de la estructura de seda II puede deberse al procedimiento de secado con gas nitrógeno que puede haber deshidratado la estructura, induciendo la formación de lámina  $\beta$  (seda II). Esto se relaciona con la capa de superficie delgada de nanofibrillas que se forma sobre gotitas de fibroína de araña nativa en aire. También se verificó la presencia de láminas  $\beta$  mediante la insolubilidad y estabilidad de los recubrimientos mostrados en la figura 7. En este experimento, se incubaron dos grupos de portaobjetos de cuarzo recubiertos con fibroína de seda (con y sin tratamiento con metanol) en solución salina tamponada con fosfato (PBS) y DMEM a  $37^\circ\text{C}$  durante 7 días. La absorbancia característica de la proteína de seda a 228 nm no mostró ningún cambio significativo para ambos grupos, indicando la presencia de la estructura de seda II insoluble y estable. Esta característica de estabilización incluso inducida por el procedimiento de secado sin metanol es particularmente útil para aplicaciones en las que no se desea la introducción de

disolventes orgánicos. También se caracterizaron las propiedades de superficie de los recubrimientos preparados tal cual y tratados con metanol mediante AFM. Micrografías de AFM en modo de contacto intermitente de  $1 \mu\text{m}^2$  preparadas sin sal mostraron que no había diferencias obvias en la topografía de superficie cuando se compararon con muestras tratadas y no tratadas con metanol. Ambas adoptaron distribuciones uniformes similares de una morfología granular. Se determinó la rugosidad de superficie (RMS) para las muestras tratadas y no tratadas a un tamaño medido de  $1,0 \times 1,0 \mu\text{m}^2$  como  $1,34 \pm 0,12 \text{ nm}$  y  $1,36 \pm 0,13 \text{ nm}$  ( $n=3$ ), respectivamente. La figura 8 muestra el perfil y la imagen de AFM de la película estratificada, con una RMS de  $1,69 \pm 0,15 \text{ nm}$  ( $n=3$ ).

Cultivo celular. Se valoró la evaluación preliminar de la adhesión, motilidad, propagación, crecimiento y diferenciación de hMSC sobre las películas delgadas de fibroína de seda de múltiples capas. Las películas usadas en este estudio eran fibroína de seda de 6 capas sobre sustrato de vidrio y se esterilizaron con etanol tal como se describió anteriormente. Se tomaron las imágenes de microscopio de las muestras teñidas con tinción de hematoxilina y eosina (H&E), fosfatasa alcalina (ALP) y alizarina roja-S (AR) con tiempo de cultivo de 1 día, 1 semana, 2 semanas y 3 semanas. Las imágenes de H&E (imágenes no mostradas) en la columna izquierda muestran el aumento de células similares a osteoblastos con morfologías de cubos o columnas con el tiempo de cultivo. De manera similar, el fenotipo similar a osteoblastos y positivo para tinción con actividad fosfatasa alcalina aumentó con el tiempo de cultivo. Está presente fosfatasa alcalina (AP) en los osteoblastos y desempeña un papel en la fase de mineralización temprana. El tinte alizarina roja-S (AR) es un indicador de fosfato de calcio que aparece cuando los osteoblastos se mineralizan. El color rojo del tinte AR indicaba la presencia de fosfato de calcio. La integridad de los recubrimientos de fibroína de seda permaneció intacta durante todos los experimentos, mostrando buena estabilidad fisiológica. Este trabajo es una valoración inicial de la estabilidad fisiológica de los recubrimientos y su soporte de la unión y diferenciación celular. Pueden usarse fibroínas de seda modificadas para optimizar los resultados. Por ejemplo, en estudios previos, las secuencias de reconocimiento de integrinas, tales como fibroína de seda modificada con RGD, en forma de película proporcionó mejoras en los resultados osteogénicos. (Sofia, S.; McCarthy, M. B.; Gronowicz, G.; Kaplan, D. L. Journal of Biomedical Materials Research, 2001, 54, 139-148.)

Se ha demostrado por primera vez la construcción de recubrimientos delgados a nanoescala de fibroína de seda de *B. mori* mediante deposición progresiva usando un procedimiento completamente acuoso. Se monitorizó el procedimiento de deposición progresiva mediante espectrofotometría UV y microbalanza de cristal de cuarzo para investigación. Tanto la absorbancia como el grosor de la película se correlacionaban linealmente con el número de capas de fibroína de seda depositadas, de manera análoga a materiales de múltiples capas fabricados a partir de polielectrolitos convencionales. El procedimiento de adsorción era estable y reproducible, oscilando el control de un grosor de capa individual entre unos cuantos y decenas de nanómetros basándose en la concentración de la fibroína de seda y sal, y el método de enjuagado. La fuerza impulsora para la deposición de la fibroína de seda sobre un sustrato sólido se atribuyó a interacciones hidrófobas así como interacciones electrostáticas parciales. El proceso de secado indujo la formación de cristal de lámina  $\beta$  en las películas, similar al tratamiento con metanol. Estas películas eran estables en condiciones fisiológicas y soportaban la adhesión, el crecimiento y la diferenciación de células madre de médula ósea humana. El alto grado de control con respecto al grosor y composición espacial del recubrimiento de fibroína de seda indican que esta técnica puede explotarse para funcionalizar superficies de biomateriales a base de proteínas para aplicaciones en dispositivos médicos y armazones de ingeniería de tejidos.

## Ejemplo II

Incorporación de dexametasona en recubrimientos de fibroína de seda a nanoescala

### Métodos

Como fármaco modelo se usó dexametasona (Dex), un corticosteroide que se ha mostrado que induce maduración de osteoblastos y crecimiento celular en células estromales derivadas de la médula ósea humana. Los glucocorticoides son también inhibidores de procesos de inflamación celular así como de la proliferación de células de músculo liso y formación de colágeno. La administración local es el modo óptimo de lograr un beneficio terapéutico puesto que muchas complicaciones están relacionadas con la exposición sistémica a esta clase de fármacos.

La fabricación de películas de fibroína de seda/dex. En esta primera etapa, se sumergió un sustrato limpiado en la disolución de inmersión de seda  $1 \text{ mg/ml}$  durante 2 minutos y posteriormente se lavó con agua desionizada durante 1 minuto. Tras las etapas de deposición y lavado, se secó el sustrato con un flujo suave de gas nitrógeno durante 2 minutos. En la segunda etapa, se sumergió el sustrato recubierto con fibroína de seda en la disolución acuosa de dex  $0,01 \text{ mg/ml}$  (para el estudio de cultivo celular) y  $1 \text{ mg/ml}$  (para el estudio de deposición) durante 2 minutos y le siguieron enjuagado y secado de la misma manera. Se repitió este procedimiento hasta que se ensambló el número de capas deseado. Se usó una microbalanza de cristal de cuarzo para investigación (RQCM) para verificar la deposición.

Se sembraron células madre de médula ósea humana P2 (HMSC) ( $5 \times 10^5$  células/portaobjetos) sobre tres grupos de portaobjetos recubiertos con fibroína de seda/dex y fibroína de seda de 6 capas esterilizados con etanol (aproximadamente  $40 \text{ nm}$  de grosor) con el fin de valorar la estabilidad fisiológica de los recubrimientos y los efectos

de dex sobre la adhesión, el crecimiento y la diferenciación *in vitro*. Se fijaron las muestras con etanol frío al 70% para evaluaciones histológicas y bioquímicas usando técnicas convencionales tales como tinción con hematoxilina y eosina, fosfatasa alcalina (ALP) y alizarina roja-S a los 1, 7, 14 y 21 días.

## 5 Resultados

Se usó RQCM para verificar la deposición. Se muestran en la figura 8 los cambios de frecuencia con la formación de película como una función del número de capas depositadas. La adsorción sucesiva de la fibroína de seda y dex indicaba una tendencia general hacia una disminución en la frecuencia (signo negativo) a medida que el número de capas aumentaba.

Se valoró la evaluación de la adhesión, motilidad, propagación, crecimiento y diferenciación de hMSC sobre las películas delgadas de fibroína de seda/dex de múltiples capas y fibroína de seda de múltiples capas. Las películas usadas en este estudio eran fibroína de seda de 6 capas y fibroína de seda/dex de 6 capas sobre sustratos de vidrio. Se tomaron las imágenes de microscopio de hematoxilina y eosina (H&E) y fosfatasa alcalina (ALP) en tres condiciones de cultivo diferentes (a: control; b: películas de seda/dex; c: dex en medios de cultivo) (imágenes no mostradas). Las imágenes de H&E muestran en todas las condiciones el aumento de células similares a osteoblastos con morfologías de cubos o columnas con el tiempo de cultivo. De manera similar, el fenotipo similar a osteoblastos y positivo para la tinción con fosfatasa alcalina aumentó con el tiempo de cultivo. Está presente fosfatasa alcalina (AP) en los osteoblastos y desempeña un papel en la fase de mineralización temprana. Hay un aumento significativo en la actividad de AP cuando está presente dex en los medios de cultivo. Sin embargo, no se observaron diferencias perceptibles entre las muestras de control y de seda/dex. Esto puede deberse a la rápida liberación de dex en el plazo de unos cuantos días o a una carga insuficiente.

Se ha demostrado que puede incorporarse dexametasona en recubrimientos ultrafinos de fibroína de seda usando un procedimiento completamente acuoso. Estos recubrimientos eran estables en condiciones fisiológicas y soportaban la adhesión, el crecimiento y la diferenciación de células madre de médula ósea humana.

Las referencias citadas a lo largo de toda la solicitud se incorporan en el presente documento como referencia.

## EJEMPLO III

Incorporación de compuestos modelo bioactivos en los recubrimientos de seda a nanoescala, ultrafinos

Se investigó la viabilidad de la incorporación de componentes biológicos en las nanocapas de fibroína de seda y el control de la cinética de liberación por medio del control de la estructura de los recubrimientos de seda. Se usaron rodamina B, Even Blue, y azoalbúmina como moléculas modelo para estudiar el comportamiento de carga y liberación, que representan fármacos de molécula pequeña y proteínas terapéuticamente relevantes.

## Parte experimental

Se llevó a cabo la fabricación de recubrimientos de fibroína de seda/molécula modelo tal como sigue: en la primera etapa, se sumergió un sustrato limpiado en la disolución acuosa de seda 2 mg/ml durante 2 minutos y posteriormente se lavó con agua desionizada durante 1 minuto. Tras las etapas de deposición y lavado, se secó el sustrato con un flujo suave de gas nitrógeno durante 2 minutos. En la segunda etapa, se sumergió el sustrato recubierto con fibroína de seda en la disolución acuosa de molécula modelo (de 0,01 a 1 mg/ml) durante 2 minutos y le siguieron el enjuagado y el secado de la misma manera. Se repitió este procedimiento según las arquitecturas diseñadas en las que la capa más externa era siempre una capa de seda. En este trabajo, se usaron dos modalidades de carga diferentes en el estudio de liberación para cada compuesto, cada uno con dos métodos de enjuagado diferentes. Se usaron los espectros de absorbancia de UV-Vis y una microbalanza de cristal de cuarzo para investigación (RQCM) para verificar la deposición.

Se investigó la liberación de compuestos a partir de los recubrimientos de múltiples capas sobre portaobjetos de microscopio de vidrio (25 X 75 mm en ambos lados) incubando los portaobjetos en 5 ml de disoluciones tampón de PBS a temperatura ambiente con agitación suave (60 rpm). En los presentes intervalos de tiempo, se tomaron muestras de sobrenadante de 2 ml y entonces se añadieron 2 ml de disolución de PBS nueva para reponer la muestra que se había eliminado con el fin de mantener un volumen constante. Se analizó el sobrenadante para determinar la cantidad de compuesto modelo eliminado usando espectroscopía UV-vis para determinar las densidades ópticas a una longitud de onda específica para cada compuesto (562 nm para rodamina B, 609 nm para Even Blue y 358 nm para azoalbúmina) y se compararon con una curva patrón generada para cada compuesto. Se sumó la cantidad de compuesto liberado en cada muestra con las cantidades a cada punto de tiempo previo y se dividió entre la cantidad total para obtener el valor de liberación acumulativa. Se hicieron experimentos por triplicado (n=3). Los datos en los gráficos representan el promedio  $\pm$  la desviación estándar.



## Resultados y discusiones

Se monitorizó la adsorción en tiempo real de compuestos modelo sobre la superficie de electrodo de oro recubierto previamente con seda usando una microbalanza de cristal de cuarzo para investigación (RQCM). Se muestran en la figura 9 cambios de masa *in situ* representativos como una función del tiempo para la adsorción de rodamina B, Even Blue y azoalbúmina sobre la superficie de electrodo de oro RQCM recubierto previamente con seda. Todas las muestras consisten normalmente en una fase de deposición inicial muy rápida, seguida por una fase más lenta con la aproximación al valor de estado estacionario. Sin embargo, los compuestos de molécula pequeña alcanzaron el estado estacionario más rápido que la proteína; casi el 92% y el 82% de la adsorción (saturación) tuvo lugar en el plazo de 2 min. para moléculas pequeñas (rodamina y Even Blue) y proteína, respectivamente. La rodamina B tuvo una adsorción superior sobre el recubrimiento de seda que Even Blue.

Se encontró un aumento lineal de los compuestos modelo incorporados como una función del número de etapas de deposición (figuras 10A, 10B). Se observó que todas las curvas seguían un perfil de liberación similar, un aumento súbito inicial no deseado seguido por una liberación más estacionaria. Sin embargo, el aumento súbito inicial se suprimió significativamente y la duración de la terminación de la liberación se prolongó considerablemente mediante el tratamiento de las películas con metanol y la adición de 6 capas de barrera de fibroína de seda. La figura 10C muestra los comportamientos de liberación de rodamina B con diferentes métodos de recubrimiento. Por ejemplo, las películas (seda/RH)<sub>6</sub>-seda preparadas enjuagando con agua y metanol tuvieron un aumento súbito inicial del 72,5% y el 57,1% en las primeras 6 h y una duración del 100% de liberación de 14 días y 16 días, respectivamente. Esto indica que el tratamiento con metanol indujo un contenido cristalino en lámina beta superior y posteriormente disminuyó la tasa de liberación. Por otro lado, las películas (seda/RH)<sub>6</sub>-seda<sub>6</sub> preparadas enjuagando con agua y metanol tuvieron un aumento súbito inicial del 44,2% y el 32,0% en las primeras 6 h y una duración del 100% de liberación de 30 días y 35 días respectivamente. La disminución adicional en la tasa de liberación se atribuyó a la superior cristalinidad y al impedimento de más barreras añadiendo más capas de seda. Sin embargo, no hubo ninguna diferencia perceptible en el aumento súbito inicial entre rodamina B y Even Blue dada la diferencia de peso molecular. La liberación de compuestos modelo de molécula pequeña es a menudo rápida y de difusión controlada. Se desea la capacidad de liberación sostenida de moléculas pequeñas y puede proporcionar una gran oportunidad en aplicaciones prácticas.

También se observó un comportamiento de liberación similar para recubrimientos cargados con azoalbúmina con diversas arquitecturas y métodos de tratamiento (figura 10D). Para todas las muestras, el aumento súbito inicial en las primeras 6 h era mucho más bajo (< 6,5%) que en muestras con moléculas pequeñas inmovilizadas. El tiempo hasta el 100% de liberación aumentó desde 21 días hasta 35 días añadiendo 3 capas de barrera de fibroína de seda y usando el tratamiento con metanol.

En este estudio, se ha explorado la viabilidad de la construcción y las propiedades de liberación de fármaco de recubrimientos de fibroína de seda capa a capa que contienen fármaco de molécula pequeña y compuestos modelo de proteína terapéuticamente relevantes. La cantidad de compuestos inmovilizados puede controlarse cambiando la concentración de la disolución de inmersión, la estructura del recubrimiento y el método de enjuagado de una manera controlada. La supresión del aumento súbito inicial y la prolongación de la liberación pueden lograrse controlando la estructura del recubrimiento tal como induciendo estructura cristalina y añadiendo efectos de impedimento de barrera.

## Estudios de biología celular de recubrimientos de seda con paclitaxel incorporado

Se llevaron a cabo estudios para valorar la eficacia de recubrimientos de seda cargados con fármaco cargado. Se usó paclitaxel en este estudio porque ha sido un fármaco ampliamente usado para endoprótesis con elución de fármaco. Es un compuesto citotóxico que provoca polimerización hiperestable de microtúbulos intracelulares, conduciendo a una detención del ciclo celular en la metafase de la mitosis. En dosis bajas, el paclitaxel da como resultado una inhibición casi completa de la proliferación de células del músculo liso vascular (VSMC). Sin embargo, esto también retarda la regeneración de células endoteliales, afectando así negativamente a la restauración de la integridad morfológica y funcional. Se evaluaron las respuestas de adhesión plaquetaria, células del músculo liso vascular humanas y células endoteliales aórticas humanas (EC) a recubrimientos cargados con paclitaxel.

## Parte experimental

Se llevó a cabo la fabricación de recubrimientos de fibroína de seda/paclitaxel de manera similar a la descrita anteriormente: en la primera etapa, se sumergió un sustrato limpiado en disolución acuosa de seda 2 mg/ml durante 2 minutos y posteriormente se lavó con agua desionizada durante 1 minuto. Tras las etapas de deposición y lavado, se secó el sustrato con un flujo suave de gas nitrógeno durante 2 minutos. En la segunda etapa, se sumergió el sustrato recubierto con fibroína de seda en disolución de paclitaxel-etanol (de 0,625 a 2,5 mg/ml) durante 2 minutos y le siguieron el enjuagado y el secado de la misma manera. Se repitió este procedimiento para obtener recubrimientos con estructura de (seda/Pac)<sub>6</sub>-seda y composiciones de baja dosis y alta dosis.

Se llevó a cabo el recuento de plaquetas basándose en el método notificado en la bibliografía. Se pusieron en

contacto las muestras así como los controles (vidrio desnudo y recubrimiento sólo con seda) con plasma rico en plaquetas del mismo donante a 37°C durante 1 h. Tras lavar suavemente con tampón muchas veces para eliminar las plaquetas no adherentes, se tiñeron las películas secadas al aire con Geishma y se examinaron mediante microscopio óptico.

5 Se sembraron células endoteliales aórticas humanas P5 y células de músculo liso aórtico humanas P2 sobre un recubrimiento de seda cargado con paclitaxel con una densidad de siembra de  $10^5$  células/cm<sup>2</sup>. Se observaron la unión y el crecimiento de células con un microscopio óptico a las 3 h, 1 día, 2 días y 4 días.

## 10 Resultados y discusiones

Se tomaron imágenes típicas de muestras puestas en contacto con plasma rico en plaqueta de superficie para lo siguiente: A: control de vidrio; B: recubrimiento de seda sin fármaco; C: recubrimiento de seda con fármaco cargado a partir de una disolución 0,625 mg/ml; D: recubrimiento de seda con fármaco cargado a partir de una disolución 1,25 mg/ml; E: recubrimiento de seda con fármaco cargado a partir de una disolución 2,5 mg/ml. Se muestra en la figura 12 el resumen del número de plaquetas relativo sobre cada tipo de muestra. La adhesión era significativamente inferior sobre los recubrimientos cargados con fármaco en comparación con vidrio desnudo y recubrimiento de seda sin fármaco, un indicio de la viabilidad de la carga y liberación de fármacos a partir de recubrimientos de seda para superficies compatibles con la sangre y el control específico (adhesión plaquetaria).

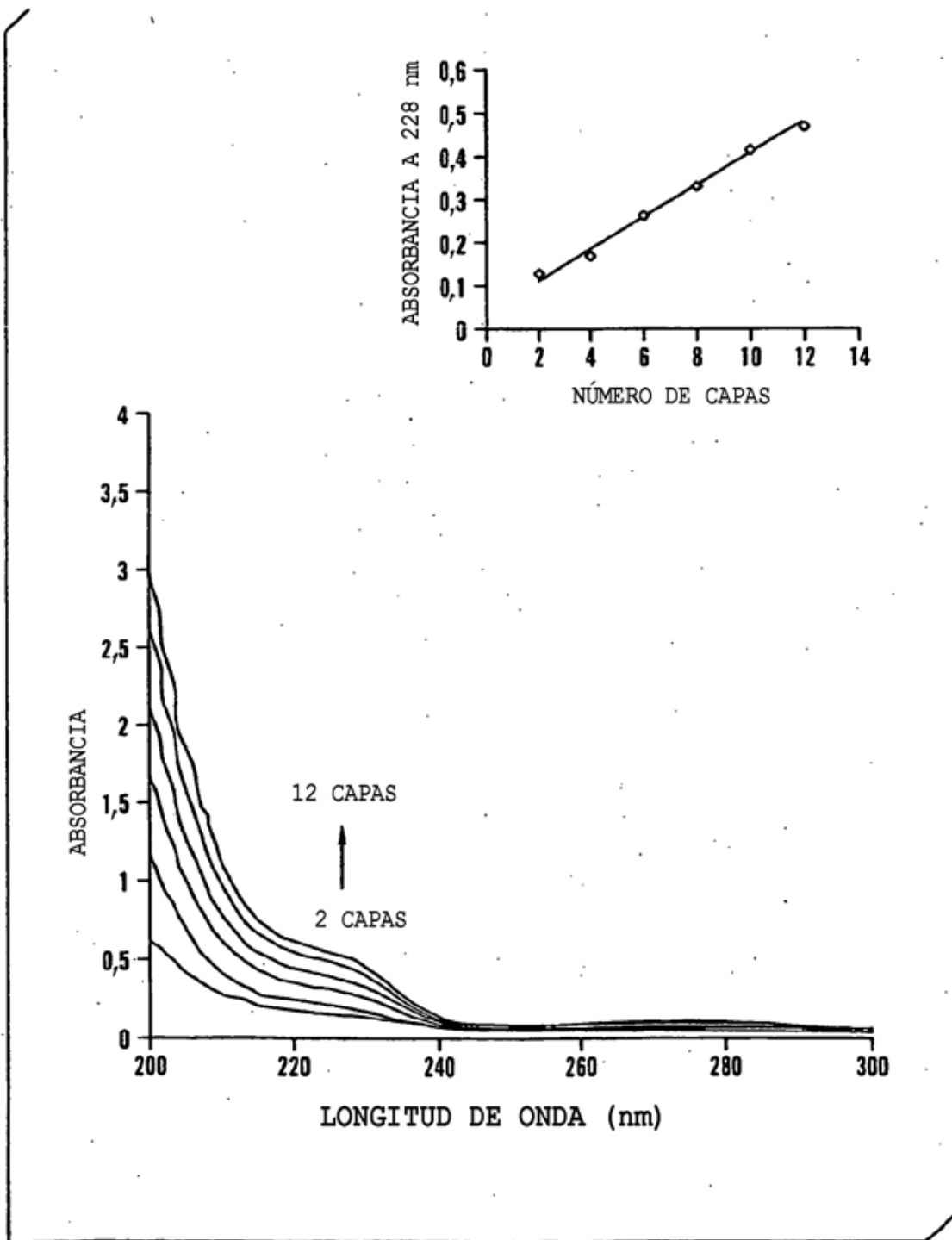
20 Se investigó la eficacia de los recubrimientos de seda cargados con paclitaxel en ensayos de viabilidad celular (datos no mostrados). Tanto VSMC como EC humanas cultivadas sobre recubrimientos de seda cargados con paclitaxel presentaban una reducción drástica en la unión y el crecimiento celular con respecto a los controles. Ninguna de las EC sobrevivieron al cultivo de dos días cuando se usó una dosis alta del fármaco.

25 En resumen, se ha demostrado la bioactividad de recubrimientos de seda cargados con paclitaxel *in vitro*. Este enfoque puede aplicarse a otras moléculas de interés. Puede incorporarse así una variedad de compuestos terapéuticos vasculares en el contexto de vascularización y cicatrización de heridas.

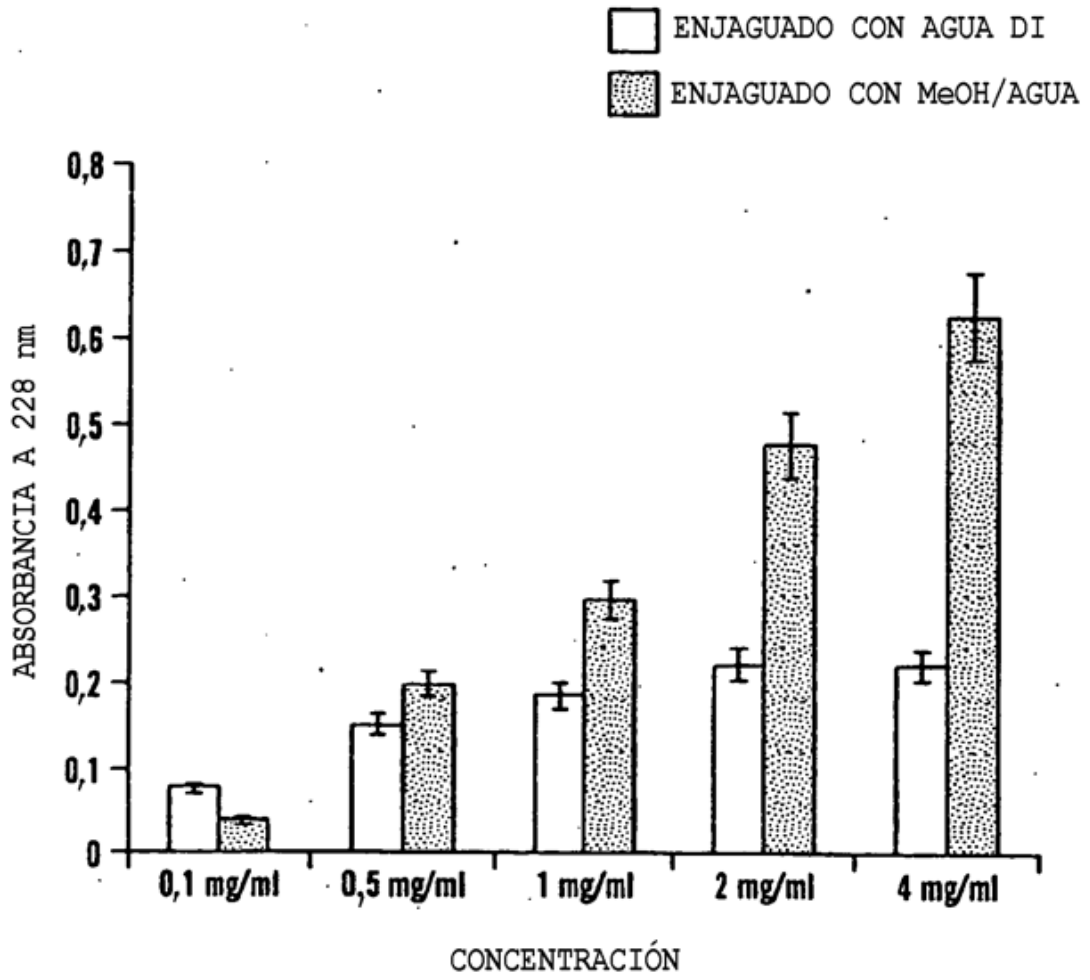
**REIVINDICACIONES**

1. Método para preparar un recubrimiento de biomaterial de seda sobre un sustrato que comprende:
  - 5 a. poner en contacto un sustrato con una disolución de fibroína de seda acuosa de manera que la disolución forma una primera capa sobre el sustrato;
  - b. deshidratar dicha primera capa mediante la exposición de la primera capa a un flujo de gas de deshidratación;
  - 10 c. poner en contacto la primera capa deshidratada con una disolución de fibroína de seda de manera que la disolución forma una segunda capa sobre la primera capa deshidratada,
  - d. deshidratar dicha segunda capa mediante la exposición de la segunda capa a un flujo de gas de deshidratación; y
  - 15 e. repetir las etapas c) y d) hasta que se deposita el número deseado de capas sobre el sustrato dando como resultado un recubrimiento estratificado sobre dicho sustrato.
- 20 2. Método según la reivindicación 1, en el que cada capa se lava con agua antes de la deshidratación.
3. Método según la reivindicación 2, en el que el agua comprende además metanol o una disolución,, tratamiento o material que induce la pérdida de agua del recubrimiento.
- 25 4. Método según la reivindicación 1, en el que el gas de deshidratación es gas nitrógeno (N<sub>2</sub>).
5. Método según la reivindicación 1, en el que el gas de deshidratación es aire caliente.
6. Método según la reivindicación 1, en el que la tasa de degradación del recubrimiento se controla ajustando la cantidad de hidratación en cada capa aumentado o disminuyendo la cantidad de tiempo que se expone la capa al gas de deshidratación.
- 30 7. Método según la reivindicación 1, en el que la tasa de degradación del recubrimiento se controla ajustando el grosor y/o la estructura de cada capa.
- 35 8. Método según la reivindicación 1, en el que el grosor de cada capa depositada se controla controlando la concentración de sal en la disolución de fibroína de seda usada para formar la capa, en el que la concentración de sal aumenta con el fin de favorecer la deposición de fibroína de seda sobre dicho sustrato o sobre la capa deshidratada cuando dicho sustrato o dicha capa deshidratada es hidrófoba; y en el que la concentración de sal disminuye con el fin de favorecer la deposición de fibroína de seda sobre dicho sustrato o sobre la capa deshidratada cuando dicho sustrato o dicha capa deshidratada es hidrófila.
- 40 9. Método según la reivindicación 1, en el que el grosor de cada capa depositada se controla controlando la concentración de fibroína en la disolución de fibroína de seda usada para formar la capa, de manera que la concentración de fibroína en la disolución de fibroína de seda aumenta para favorecer la deposición de fibroína de seda sobre dicho sustrato o sobre la capa deshidratada.
- 45 10. Método según la reivindicación 1, en el que el grosor de cada capa depositada se controla controlando el pH de la disolución de fibroína de seda usada para formar la capa, de manera que cuando el sustrato es un sustrato cargado negativamente, el pH de la disolución de fibroína de seda se reduce con el fin de favorecer la deposición de la fibroína de seda sobre dicho sustrato o sobre la capa deshidratada; y cuando el sustrato es un sustrato cargado positivamente, el pH de la disolución de fibroína de seda se aumenta con el fin de favorecer la deposición de la fibroína de seda sobre dicho sustrato o sobre la capa deshidratada.
- 50 11. Método según la reivindicación 3, en el que el grosor de cada capa depositada se controla controlando la razón de metanol con respecto a agua usada en el lavado de cada capa antes de la deshidratación de cada capa, en el que un contenido en metanol superior favorece la deposición de la fibroína de seda sobre dicho sustrato o sobre la capa deshidratada.
- 55 12. Método según la reivindicación 1, en el que el grosor de al menos una capa oscila entre aproximadamente 1 y aproximadamente 12 nanómetros.
- 60 13. Método según la reivindicación 1, en el que el grosor de al menos una capa oscila entre aproximadamente 50-5.000 nanómetros.
- 65 14. Método según la reivindicación 1, en el que el sustrato es un dispositivo biomédico.

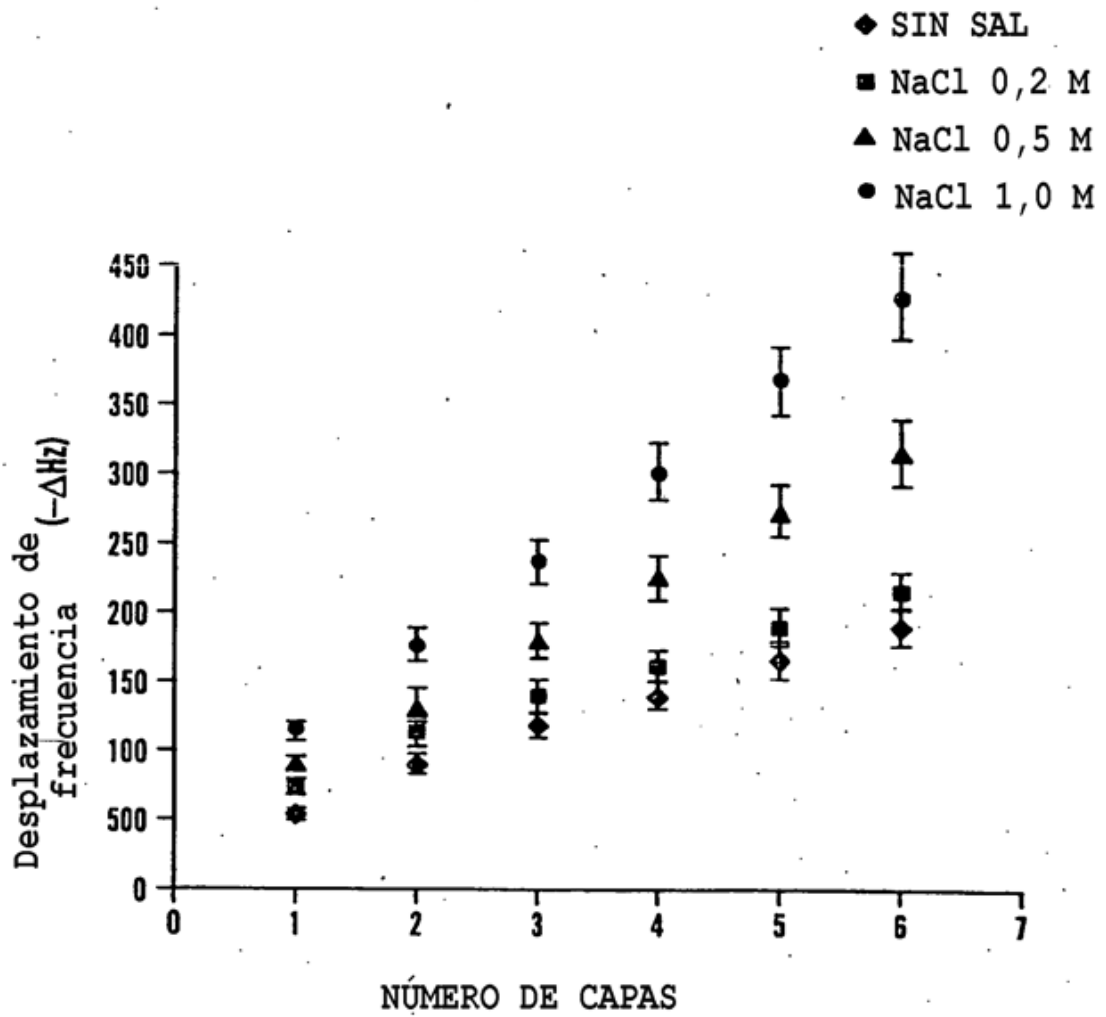
- 5
15. Método según la reivindicación 1, en el que el sustrato es un biomaterial.
16. Método según la reivindicación 1, en el que el sustrato es un biosensor.
17. Método según la reivindicación 1, en el que el sustrato es un armazón de ingeniería de tejidos.
- 10
18. Método según la reivindicación 1, en el que el sustrato es un objeto de plástico, madera, vidrio, cerámica, cuero, tela, sintético o metal.
19. Método según la reivindicación 1, en el que la disolución de fibroína de seda comprende además un material bioactivo.
- 15
20. Método según la reivindicación 19, en el que el material bioactivo es una célula.
21. Método según la reivindicación 19, en el que el material bioactivo es un virus.
22. Método según la reivindicación 19, en el que el material bioactivo es un metal.
- 20
23. Método según la reivindicación 19, en el que el material bioactivo es un agente terapéutico.
24. Método según la reivindicación 19, que comprende además poner en contacto el sustrato con una disolución de fibroína de seda acuosa que no contiene material bioactivo añadido.
- 25
25. Formulación farmacéutica para la liberación controlada de al menos un agente terapéutico, producido mediante el método según la reivindicación 1.
26. Formulación farmacéutica según la reivindicación 25, en la que el agente terapéutico se selecciona del grupo que consiste en una proteína, un péptido, ácido nucleico, PNA, aptámero, anticuerpo y molécula pequeña.
- 30
27. Sustrato que comprende un recubrimiento de biomaterial de fibroína de seda estratificado que comprende una pluralidad de capas de fibroína de seda, en el que cada capa es de aproximadamente 1 a aproximadamente 12 nm de grosor.
- 35
28. Sustrato según la reivindicación 27, en el que al menos una capa del recubrimiento comprende un material bioactivo.
29. Sustrato que comprende un recubrimiento de biomaterial de fibroína de seda que oscila entre aproximadamente 1 y aproximadamente 12 nm de grosor, en el que el recubrimiento comprende un material bioactivo.
- 40
30. Sustrato según la reivindicación 28 o la reivindicación 29, que comprende además un recubrimiento de biomaterial de fibroína de seda sobre la capa que contiene el material bioactivo.
- 45
31. Sustrato recubierto producido mediante el método según la reivindicación 1.
32. Sustrato según la reivindicación 31, siendo el sustrato una endoprótesis, sutura, malla, placa, tornillo, catéter, tubo, gel, armazón poroso tridimensional o armazón de ingeniería de tejidos.
- 50
33. Sustrato según la reivindicación 28 o la reivindicación 29, en el que el material bioactivo es una célula.
34. Sustrato según la reivindicación 28 o la reivindicación 29, en el que el material bioactivo es un virus.
- 55
35. Sustrato según la reivindicación 28 o la reivindicación 29, en el que el material bioactivo es un metal.
36. Sustrato según la reivindicación 28 o la reivindicación 29, en el que el material bioactivo es un agente terapéutico.



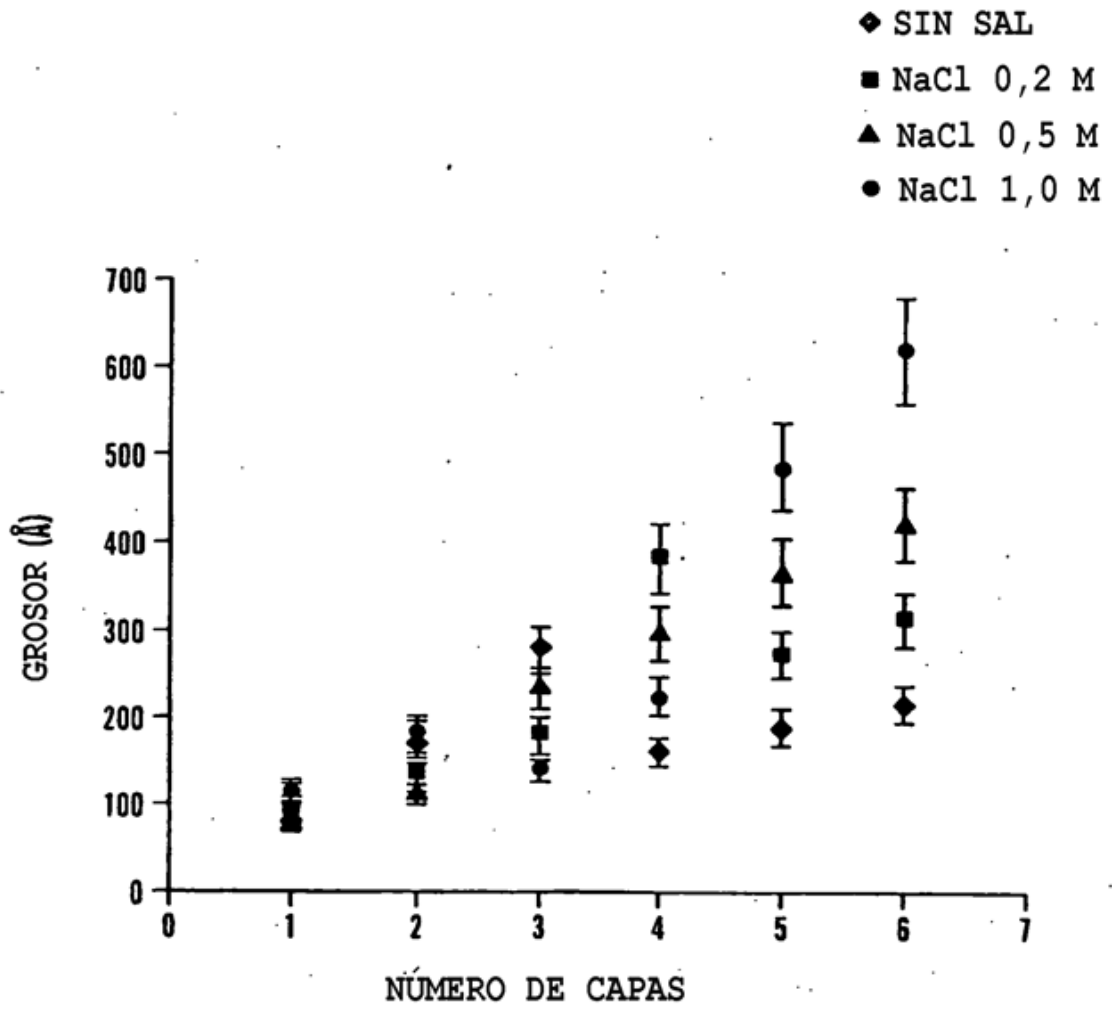
**FIG. 1**



**FIG. 2**

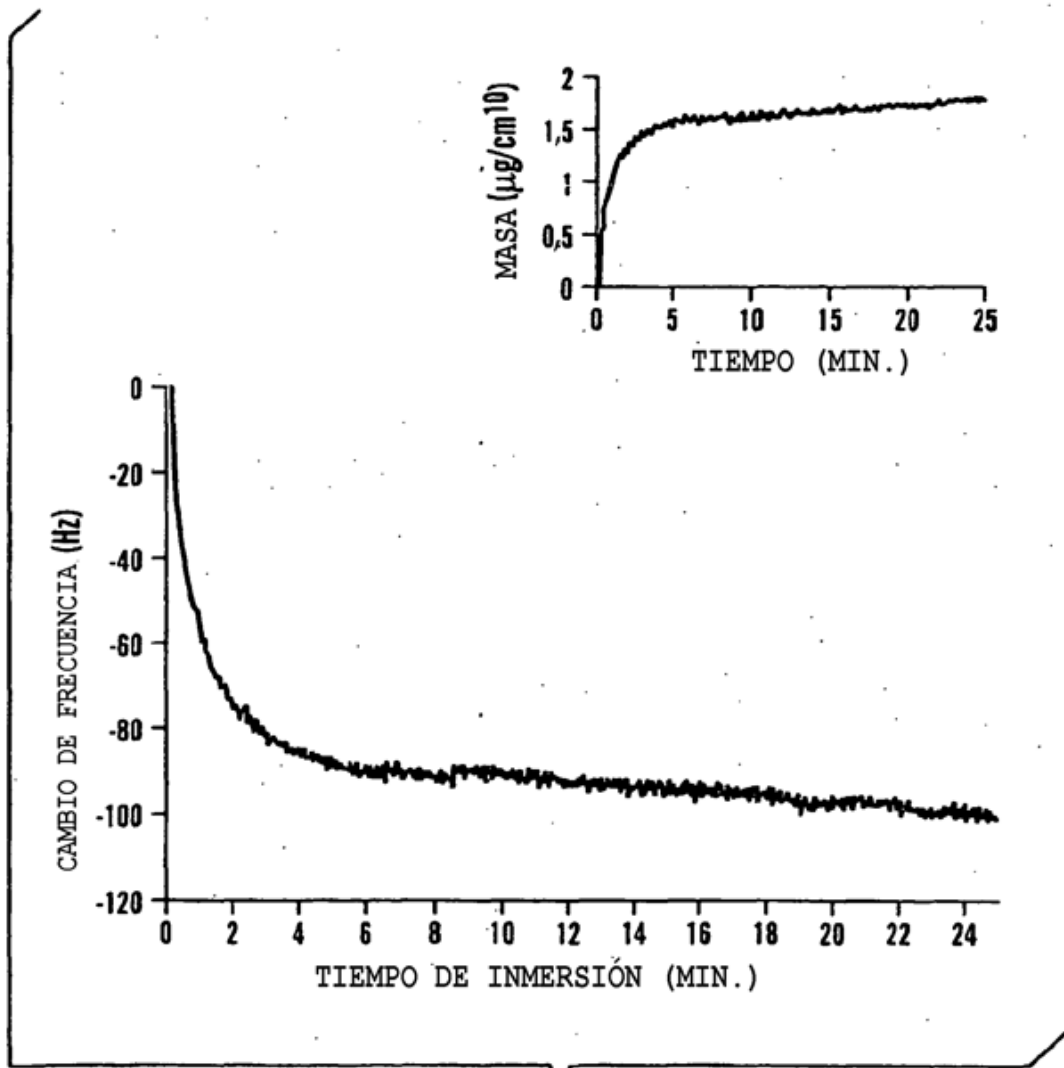


**FIG. 3A**

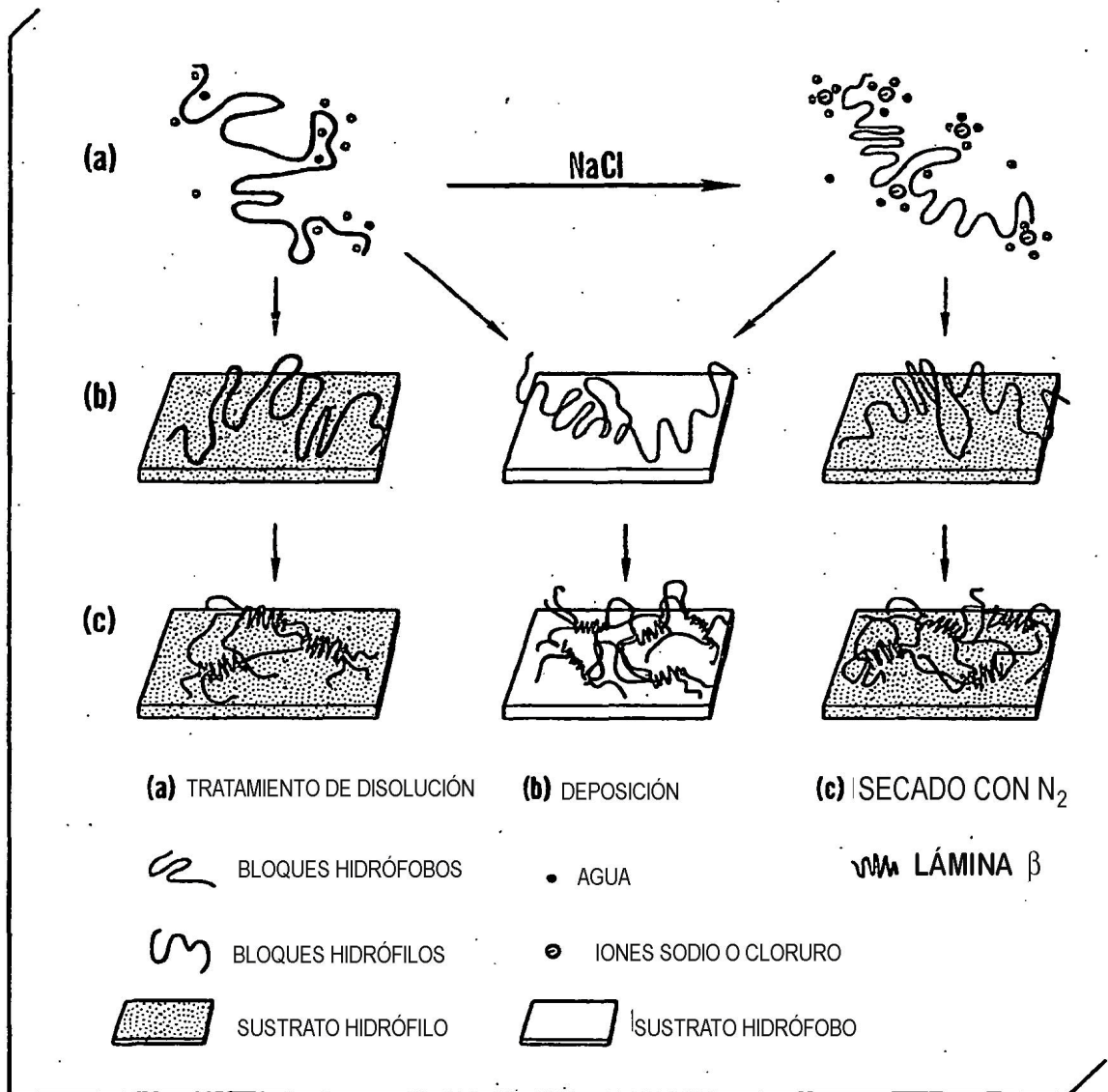


**FIG. 3B**

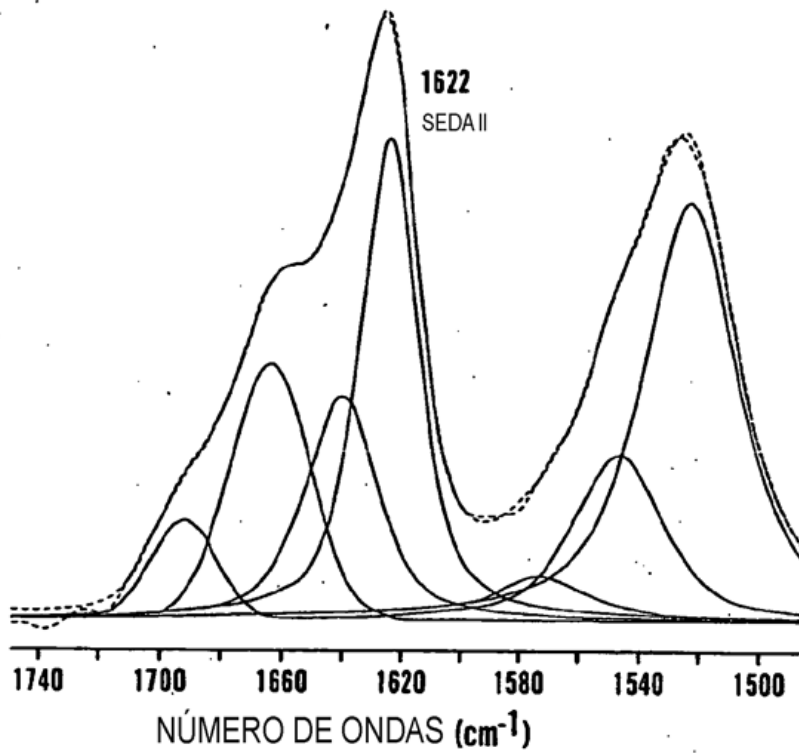




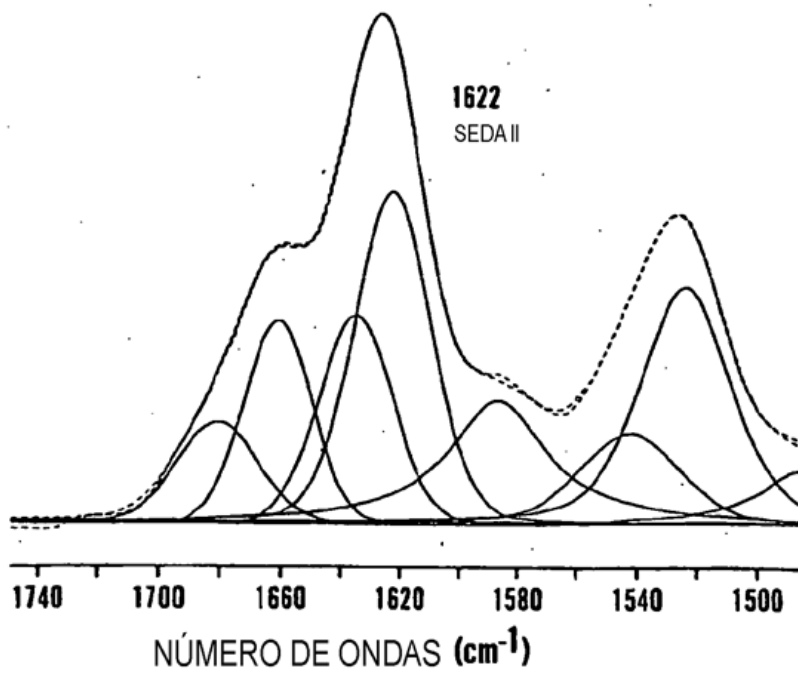
**FIG. 4**



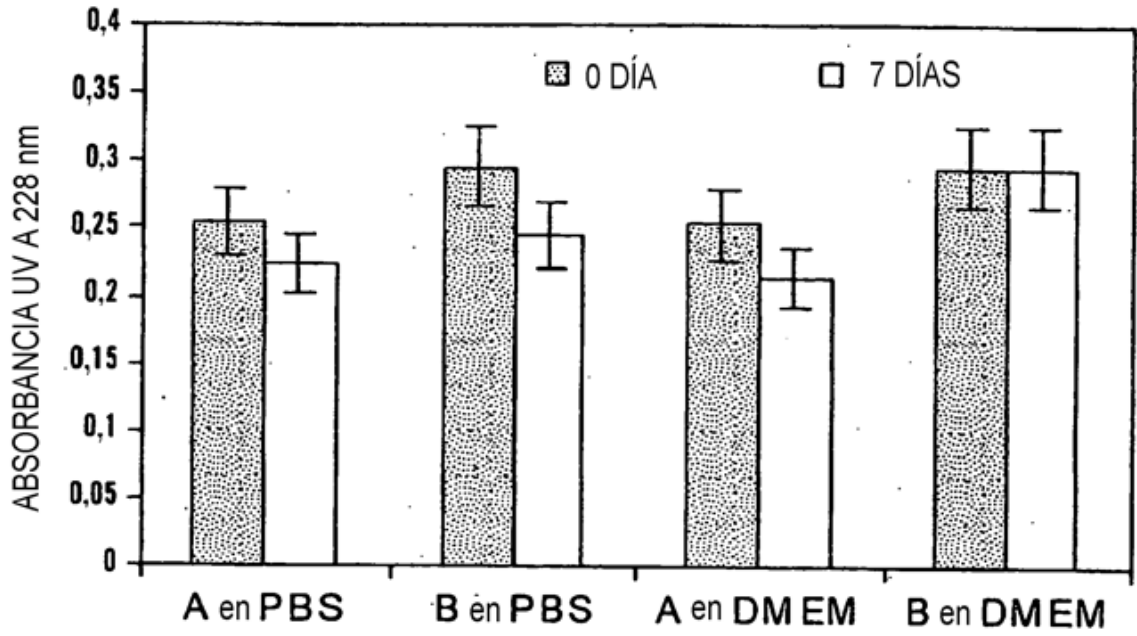
**FIG. 5**



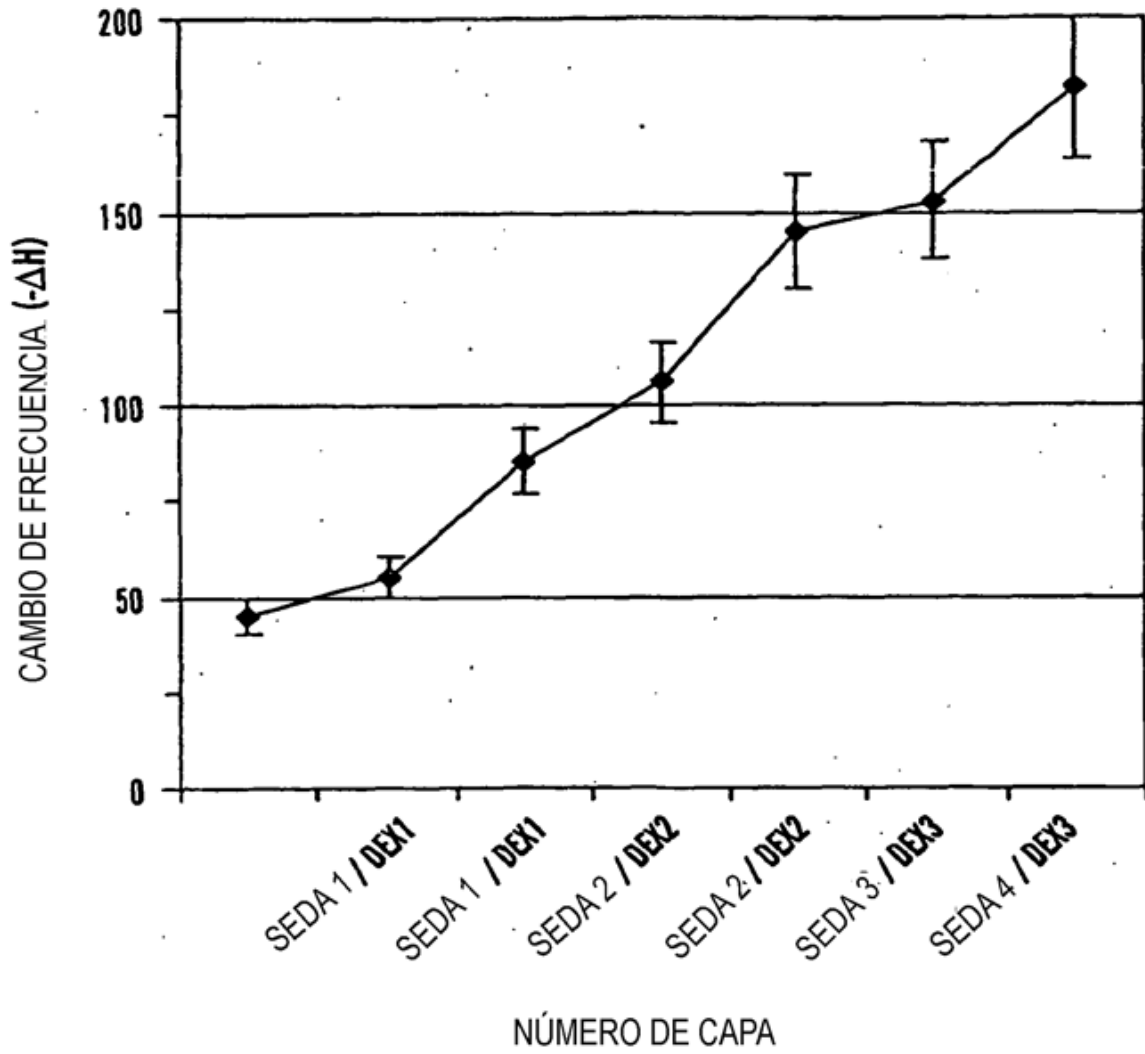
**FIG. 6A**



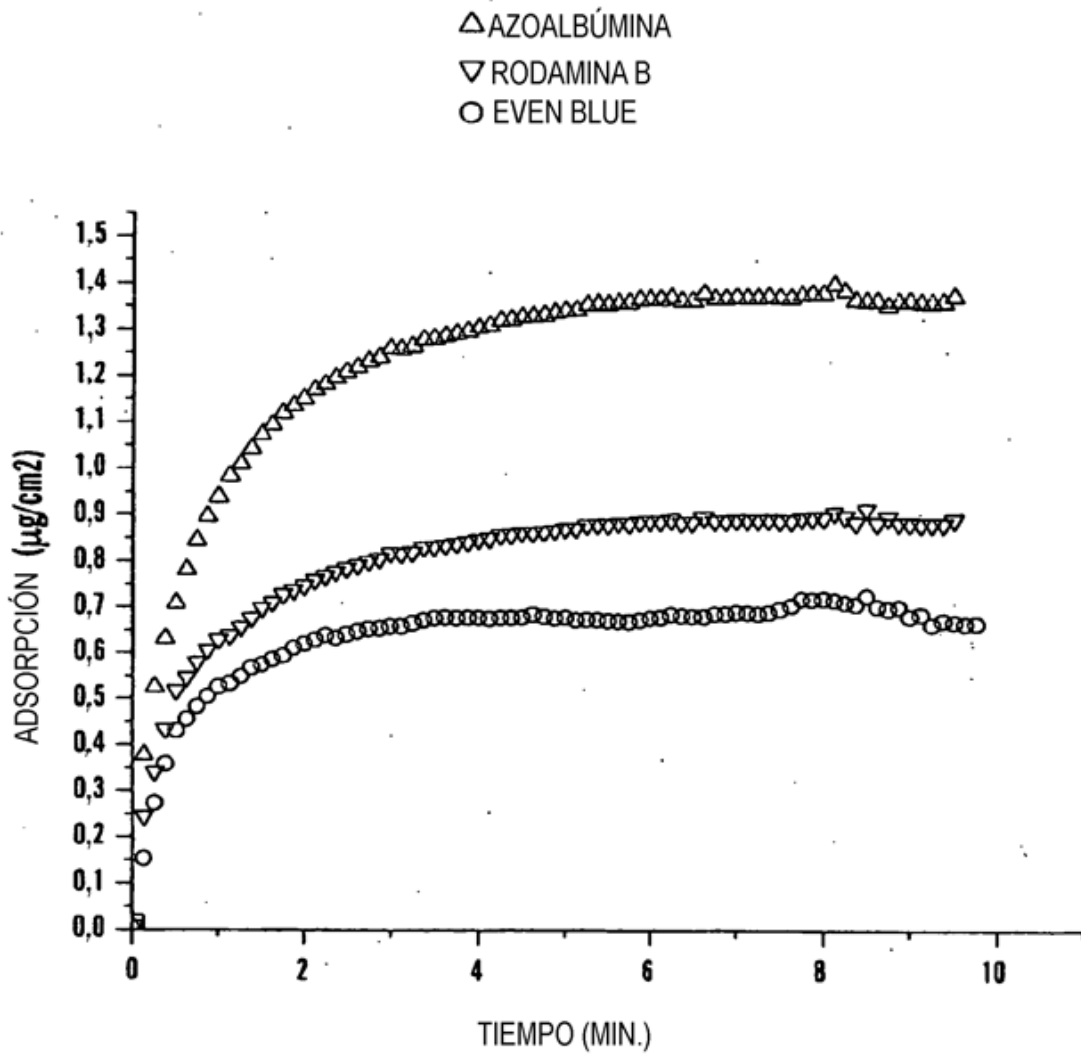
**FIG. 6B**



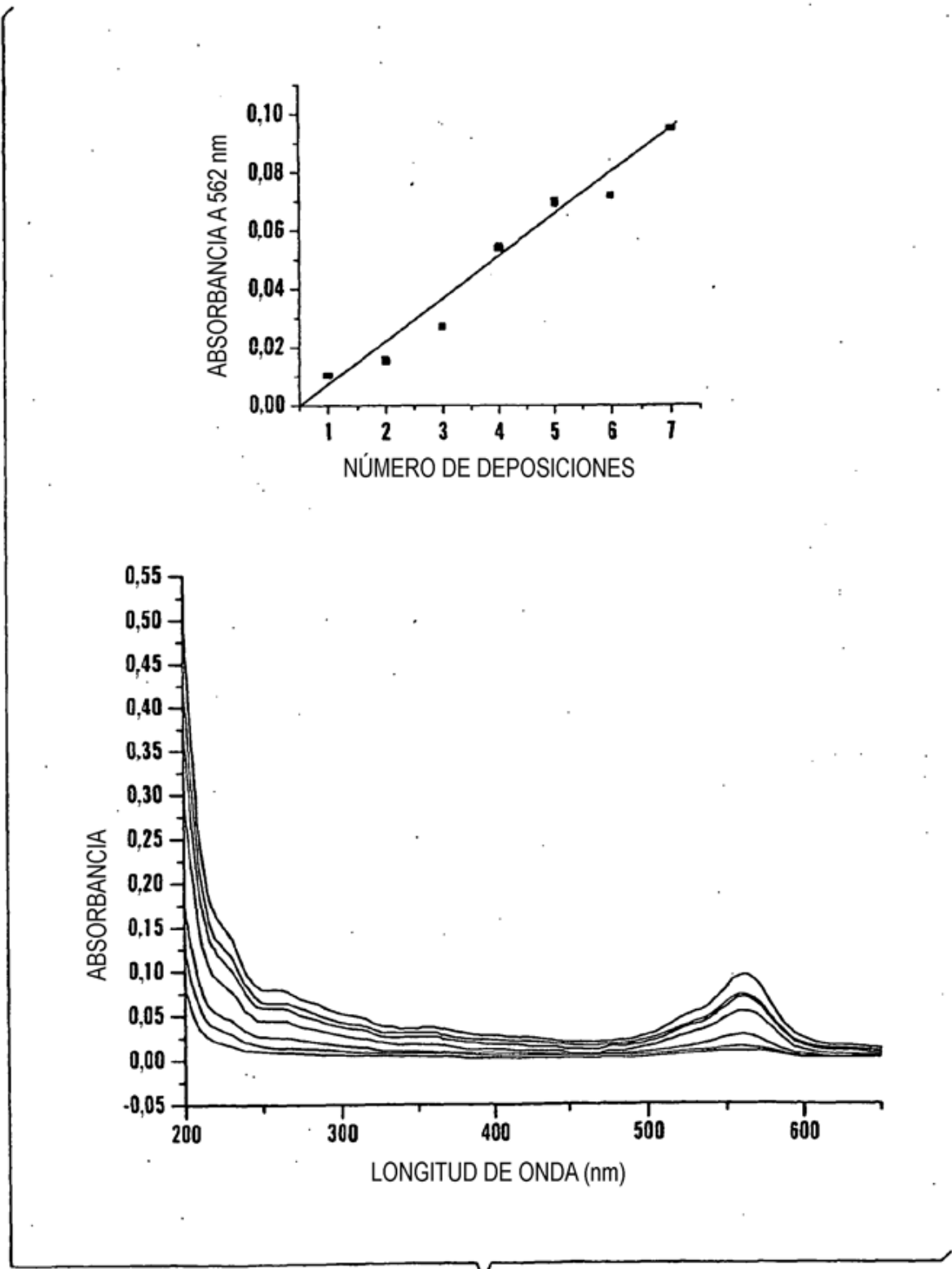
**FIG. 7**



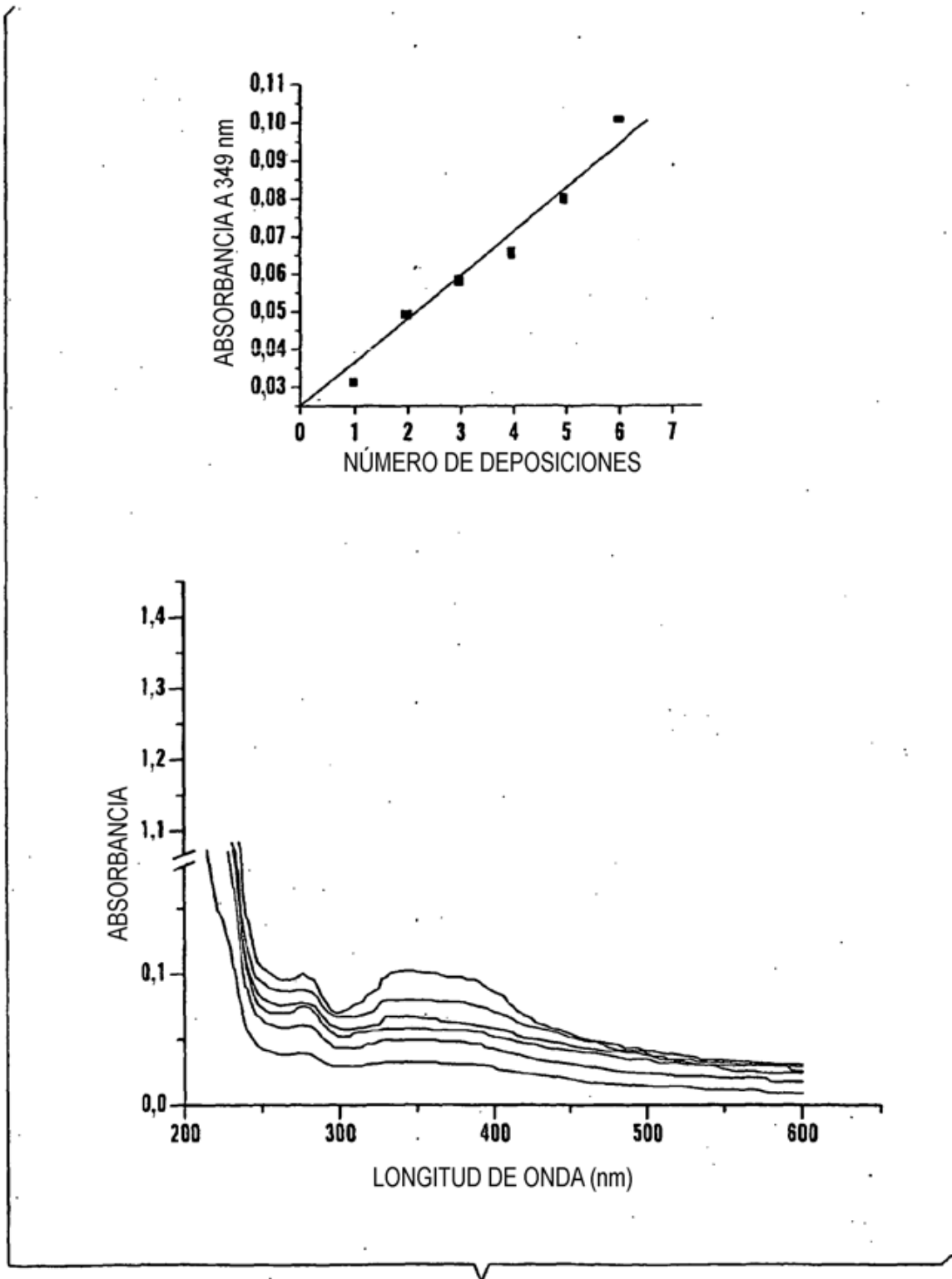
**FIG. 8**



**FIG. 9**

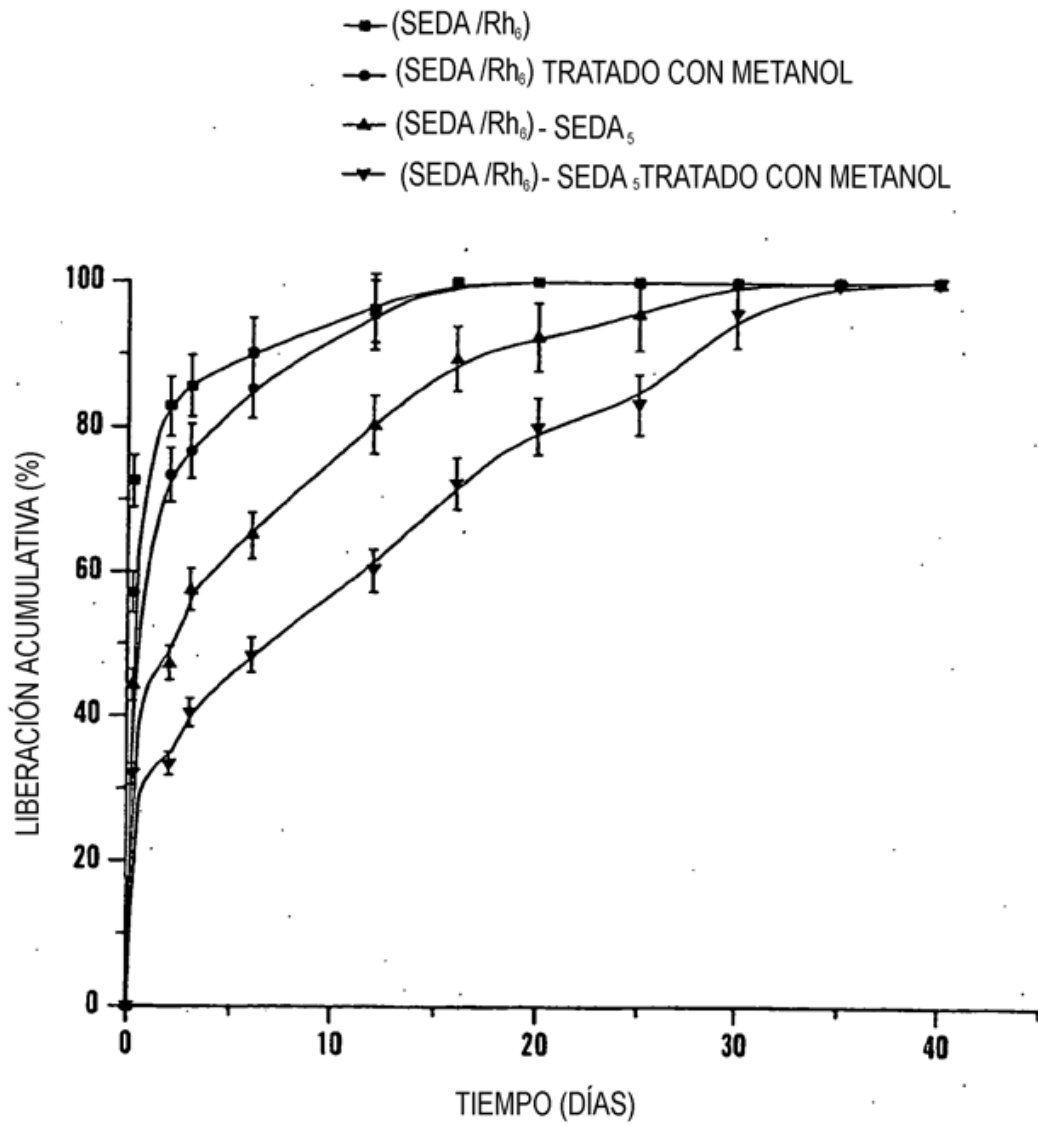


**FIG. 10A**

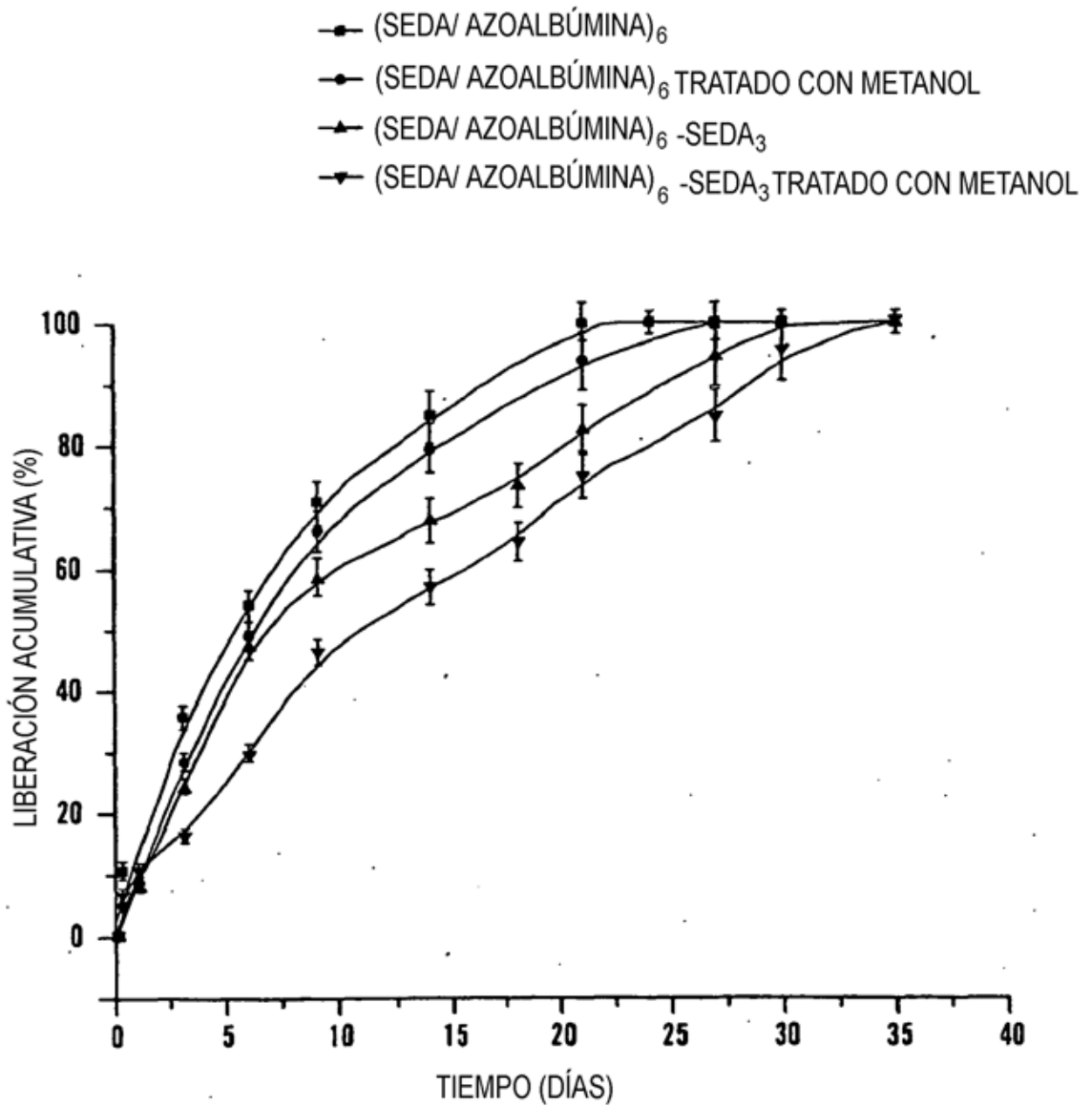


**FIG. 10B**

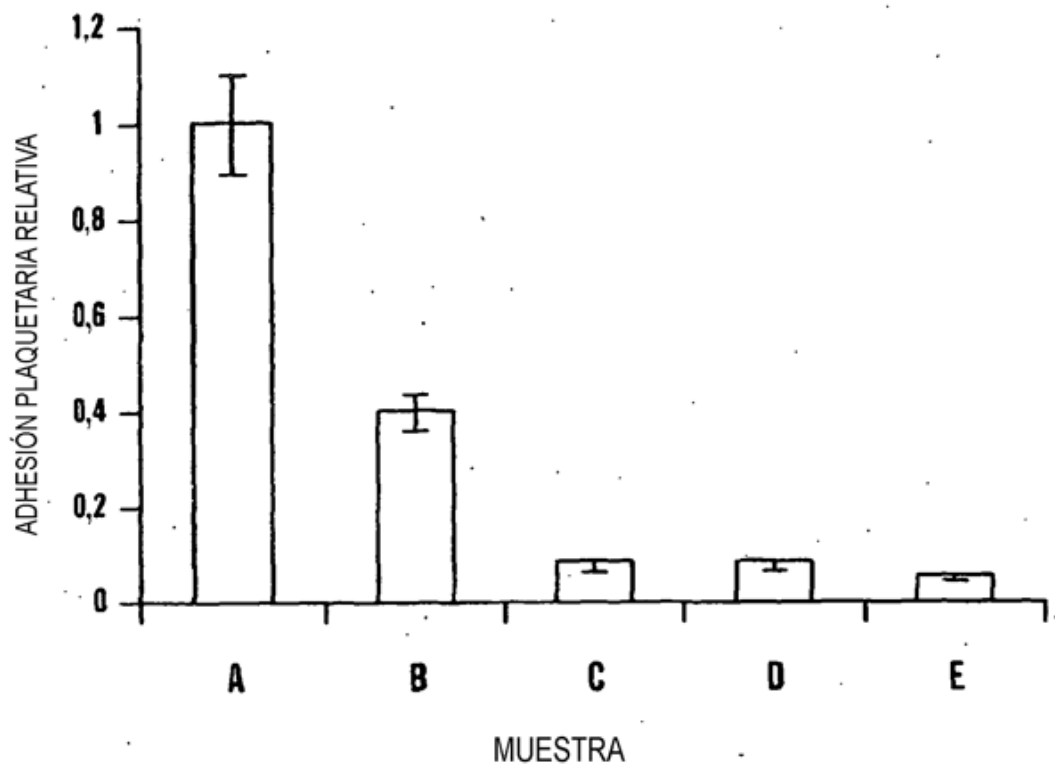




**FIG. 10C**



**FIG. 10D**



**FIG. 11**