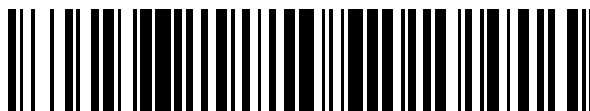


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 414 879**

51 Int. Cl.:

A61K 38/17 (2006.01)

A61L 27/52 (2006.01)

A61L 27/22 (2006.01)

A61K 38/01 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **20.04.2010 E 10720211 (1)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **12.06.2013 EP 2421549**

54 Título: **Hidrogeles de fibroína de seda y usos de éstos**

30 Prioridad:

20.04.2009 US 170895 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:

23.07.2013

73 Titular/es:

**ALLERGAN, INC. (100.0%)
2525 Dupont Drive
Irvine, CA 92613, US**

72 Inventor/es:

**ALTMAN, GREGORY, H.;
HORAN, REBECA, L.;
COLLETTE, ADAM, L. y
CHEN, JING SONG**

74 Agente/Representante:

CARPINTERO LÓPEZ, Mario

ES 2 414 879 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

Hidrogeles de fibroína de seda y usos de éstos

Referencia cruzada

5 Esta solicitud de patente reivindica prioridad conforme a 35 U.S.C. § 119(e) a la Solicitud de Patente Provisional U.S. No. de Serie 61/170.895 presentada el 20 de abril, 2009.

Campo de la invención

10 La presente especificación describe fibroína de seda purificada y método para purificar fibroínas de seda, hidrogeles que comprenden fibroína de seda con o sin un péptido anfílico y métodos para preparar hidrogeles que comprenden fibroína de seda y el uso de hidrogeles de fibroína de seda en una variedad de usos médicos, incluyendo, sin limitación, rellenos para espacio tisular, moldes para la reconstrucción o regeneración de tejidos, soportes para células en aplicaciones de ingeniería de tejidos y para modelos de enfermedad, un recubrimiento superficial para mejorar la función de dispositivos médicos, o como una plataforma para la administración de fármacos.

Antecedentes

15 Seda se refiere a un producto filamentosos secretado por un organismo tal como una araña o gusano de seda. La fibroína es el componente estructural principal de la seda. Está compuesta por unidades monoméricas que comprenden una cadena pesada de aproximadamente 350 kDa y una cadena ligera de aproximadamente 25 kDa, e intercalada en los monómeros de fibroína está otra proteína de aproximadamente 25 kDa derivada del gen P25. La proporción de cadena pesada:cadena ligera:proteína P25 es aproximadamente 6:6:1. La fibroína es secretada por las glándulas de la seda del organismo como una pareja de fibrillas complementarias denominadas "hebras". Al dejar las hebras de fibroína las glándulas, se recubren con sericina, una sustancia semejante al pegamento que une las hebras entre sí. Habitualmente, la sericina es antigénica y puede estar asociada con una reacción tisular adversa cuando la seda que contiene sericina se implanta *in vivo*.

25 Las fibras de seda del gusano de la seda disponibles tradicionalmente en el mercado comercial se denominan habitualmente "desgomadas", que se refiere a la relajación y eliminación de una parte de la cubierta de sericina que rodea las dos hebras de fibroína mediante lavado o extracción en agua jabonosa caliente. Esta seda desgomada contiene o esta recubierta habitualmente con sericina y otras impurezas con el fin de unir el multifilamento doblado entre sí en una única fibra. Por lo tanto, la seda desgomada, a no ser que se indique explícitamente lo contrario, contiene típicamente un veinte por ciento a veintiocho por ciento (en peso) de sericina y no puede asumirse que carezca de sericina.

30 Las fibras de seda se han apreciado históricamente en cirugía por sus propiedades mecánicas, particularmente en la forma de filamentos trenzados usados como material de sutura. La sericina residual que puede estar contenida en estos materiales permanece como un obstáculo potencial para su uso como un biomaterial ya que presenta la posibilidad de una respuesta inmune intensificada. Sin embargo, esta contaminación con sericina puede eliminarse sustancialmente, lo que resulta en una fibroína que virtualmente carece de sericina que puede usarse bien como fibras o disuelta y reconstituida de varias formas. Por ejemplo, la seda natural del gusano de seda *Bombyx mori* puede someterse a extracción de sericina, centrifugado en ovillos y usarse entonces para crear una matriz con una resistencia a la tracción adecuada para aplicaciones tales como ligamentos y tendones obtenidos por bioingeniería. El uso de materiales de seda regenerados también se ha propuesto para varios propósitos médicos incluyendo la protección de heridas, sustrato de cultivo celular, inmovilización de enzimas, lentes blandas y agentes de liberación de fármacos.

40 Los dispositivos de fibroína de seda bien nativos, disueltos o reconstituidos, no contienen típicamente dominios de unión a células tales como los encontrados en el colágeno, fibronectina y muchas otras moléculas de la matriz extracelular (ECM). La fibroína también es muy hidrofóbica debido a la red cristalina rica en láminas β de la proteína fibroína central. Estos dos factores se unen para limitar severamente la capacidad de las células huésped nativas de unirse a e interactuar con dispositivos de seda implantados, ya que ni las células inflamatorias como los macrófagos ni las células reparadoras como los fibroblastos son capaces de unirse fuertemente, infiltrarse y bioresorber los dispositivos de fibroína de seda. En el caso de la seda virgen y suturas de seda negras trenzadas (recubiertas con cera o silicona), esto se manifiesta típicamente en una respuesta severa a cuerpo extraño caracterizada por la encapsulación periférica. La seda que sustancialmente carece de sericina experimenta una respuesta similar aunque sustancialmente menos vigorosa cuando se implanta. En esencia, las células huésped identifican la seda como un cuerpo extraño y optan por separarla con una pared en lugar de interactuar con ella. Esto limita severamente el potencial a largo plazo posterior del dispositivo particularmente en lo que se refiere al crecimiento tisular hacia el interior y remodelado y potencialmente, la utilidad global del dispositivo. Si fuera posible proporcionar una formulación de biomaterial más eficaz para mediar las

interacciones huésped-dispositivo mediante la cual se proporciona a las células una superficie reconocible, aceptable y por lo tanto biocompatible, se mejoraría dramáticamente la utilidad biológica, médica y quirúrgica de la seda.

Un posible medio para introducir esta interacción mejorada célula-material es alterar el formato del material fibroína de seda en una matriz más biocompatible. La manipulación de la fibroína de seda para prepararla en una formulación de hidrogel de seda es una opción particularmente interesante porque consiste en una red de proteína de seda que está completamente saturada con agua, acoplado la resiliencia molecular de la seda con la biocompatibilidad de un material "húmedo". La generación de un hidrogel de seda puede conseguirse brevemente rompiendo los polímeros de fibroína de seda nativa en sus componentes monoméricos individuales usando una especie de disolvente, reemplazando el disolvente con agua e induciendo una combinación de agregación inter e intra-molecular. Se ha mostrado que la transición sol-gel puede iniciarse selectivamente cambiando la concentración de la proteína, temperatura, pH y aditivo (por ejemplo, iones y polímeros higroscópicos tales como poli(etileno óxido) (PEO), poloxámero y glicerol). El incremento de la concentración de la seda y la temperatura puede alterar el tiempo que tarda la gelificación de la seda incrementando la frecuencia de interacciones moleculares, incrementando las posibilidades de la nucleación del polímero. Otro medio para acelerar la gelificación de la seda es mediante el uso de iones de calcio que pueden interactuar con los bloques hidrofílicos en los extremos de las moléculas de seda en disolución antes de la gelificación. Se ha mostrado que la disminución del pH y la adición de un polímero hidrofílico aumentan la gelificación, posiblemente disminuyendo la repulsión entre las moléculas de seda individuales en disolución y posteriormente compitiendo con las moléculas de fibroína de seda en disolución para unir agua, causando la precipitación y agregación de la fibroína.

Se han producido otros geles de fibroína de seda, por ejemplo, mezclando una disolución acuosa de fibroína de seda con biomateriales derivados de proteína tales como gelatina o quitosán. Los materiales de proteínas recombinantes basados en la estructura de la fibroína de seda también se han usado para crear estructuras de hidrogel auto-ensambladas. Otro gel de seda, un gel fibroína de seda-poli-(vinil alcohol) se creó por liofilización o secado al aire de una disolución acuosa, reconstituyendo en agua y permitiendo que se auto-ensamblara. Los hidrogeles de seda también se han generado exponiendo la disolución de seda a una condición de temperatura de 4°C (Thermgel) o añadiendo glicerol al treinta por ciento (v/v) (Glygel). Los hidrogeles de seda creados mediante un proceso de congelación-descongelación no sólo se han generado sino que también se han usado *in vitro* como un soporte de cultivo celular.

El uso de hidrogeles de seda como matrices de biomateriales también se ha explorado de varias maneras. Se investigó la búsqueda general de hidrogeles como plataformas para administración de fármacos, específicamente el comportamiento de la liberación de benfotiamina (una variante sintética de la vitamina B₁) acoplado con hidrogel de seda. El estudio reveló que tanto la concentración de seda como la adición de otros compuestos puede tenerse en cuenta en el perfil de liberación eventual del material. De manera similar, la liberación de dextrano marcado con FITC de un hidrogel de seda podría manipularse alterando las concentraciones de seda en el gel.

También se han realizado estudios adicionales de hidrogeles de seda *in vivo*. Por ejemplo, el material se ha usado *in vivo* para proporcionar un soporte para reparar huesos rotos en conejos y mostró una velocidad de cicatrización acelerada respecto a los animales control. De forma particularmente interesante, el estudio *in situ* también ilustró que la formulación particular del hidrogel de seda no inducía una respuesta inmune extensa del huésped.

Etienne et al. 2009, describe un hidrogel de seda para el aumento de tejido blando que no contiene un péptido anfílico.

A pesar del comienzo prometedor de las formulaciones de hidrogel de seda *in vivo*, la contaminación de sericina permanece como una preocupación en su generación y uso como con la fibroína nativa por razones de biocompatibilidad así como el potencial de la sericina de alterar la cinética de la gelificación. La existencia de moléculas de sericina en la disolución de seda intermedia antes de la gelificación también puede comprometer la calidad estructural final del gel, es decir, la distribución de la estructura de láminas β. Por estas razones, la eliminación de la sericina del material de fibroína de seda antes de la fabricación del hidrogel sigue siendo una preocupación. El potencial para la interrupción de la cinética de la gelificación y la estructura por contaminantes también presenta la necesidad del desarrollo de un proceso que asegure consistentemente una uniformidad estructural y biocompatibilidad.

Resumen de la invención

Las realizaciones descritas en la presente memoria proporcionan formulaciones de hidrogel de seda que pueden ser útiles para una variedad de usos médicos. Más específicamente, las realizaciones ejemplares de la presente invención proporcionan geles que incluyen fibroína de seda y péptidos. Otras realizaciones ejemplares proporcionan el uso de potenciadores orgánicos que mejoran la utilidad del dispositivo y potenciadores peptídicos funcionales que pueden mejorar la utilidad y biocompatibilidad de las formulaciones de seda. Las realizaciones de hidrogel de seda pueden usarse como rellenos de espacio tisular, moldes para la reconstrucción o regeneración de tejidos, soportes para cultivo celular para ingeniería de tejidos y para modelos de enfermedad, recubrimiento superficial para mejorar la función de dispositivos médicos o dispositivos de administración de fármacos.

- Una realización proporciona un gel de seda inyectable que comprende una fase de gel y una fase vehicular (que puede proporcionar lubricidad adicional) en la que la fase de gel comprende agua, fibroína de seda sustancialmente desprovista de sericina y un péptido anfílico. En otra realización, la fase de gel es aproximadamente 1% a 99%, por ejemplo, la fase de gel es aproximadamente 50% a aproximadamente 99% del volumen total de la formulación proporcionando la fase vehicular el resto. Por ejemplo, la fase de gel es aproximadamente 75% del volumen total de la formulación y la fase vehicular es el 25% restante. La fase de gel puede comprender aproximadamente 0,5% a aproximadamente 20% de proteína fibroína de seda en masa, por ejemplo, aproximadamente 1% a aproximadamente 10% o aproximadamente 4% a aproximadamente 6%. En una realización, la fibroína de seda comprende aproximadamente 0,5% a aproximadamente 9,9% de la masa total de la formulación.
- 5
- 10 En una realización particular, el péptido es un péptido anfílico que consiste en una región de cola, seguida de una región espaciadora y finalmente la secuencia arginina-glicina-ácido aspártico, conocida como el resto RGD. Por ejemplo, el péptido total tiene una longitud de 23 aminoácidos (de aquí en adelante referido como "23RGD"). La fase de gel puede comprender, por ejemplo, una proporción molar de aproximadamente 1:100 moles a aproximadamente 100:1 moles de este péptido por mol de fibroína de seda.
- 15 Otra realización ejemplar proporciona una formulación de gel inyectable que comprende fibroína de seda y un péptido anfílico, en la que la formulación comprende de aproximadamente 1% a aproximadamente 20%, por ejemplo, aproximadamente 4% a aproximadamente 6% de fibroína de seda y el péptido anfílico es 23RGD.
- Otra realización más proporciona una formulación de gel inyectable que comprende de fibroína de seda y 23RGD, en la que la formulación comprende de aproximadamente 4% a aproximadamente 6% de fibroína de seda y la concentración de 23RGD es 3:1 moles de 23RGD/mol de seda.
- 20 Otra realización particular proporciona una formulación de gel implantable que comprende fibroína de seda y el 23RGD en la que la formulación de gel comprende de aproximadamente 4% a aproximadamente 8% de fibroína de seda y la concentración de 23RGD es aproximadamente 1:10 a 10:1 moles de 23RGD por mol de fibroína de seda.
- En otra realización, la fase de gel comprende una estructura proteica que consiste predominantemente en la conformación de lámina β con componentes de hélice α , espiral al azar y estructuras no ordenadas.
- 25 Otra realización ejemplar de la invención se refiere a un kit que incluye una formulación de gel de seda estéril envasada en una jeringa de 1 mL con una aguja de 26g y mezclada con un material referido comúnmente como "anestésico local". Este anestésico podría ser más específicamente lidocaína. Dependiendo de la aplicación, el kit incluye jeringas con tamaños de 0,5 mL a 60 mL, cuando las aplicaciones que requieren volúmenes mayores (por ejemplo, rellenos óseos, rellenos de disco) se suministran en una jeringa con un tamaño mayor. Además, el calibre de la aguja se ajusta según el sitio de la inyección con un rango aceptable de agujas de 10g a 30g. Por ejemplo, las agujas de 26g a 30g se usan para inyecciones intradérmicas. Además, el anestésico local no está mezclado en la formulación para aplicaciones en las que el anestésico se aplica preferiblemente separadamente o en aplicaciones para las que no se necesita un anestésico.
- 30 En otra realización, la formulación de gel de seda se procesa en un sistema discontinuo mediante la obtención de una disolución de seda al 8%, añadiendo etanol/23RGD para generar un gel firme al 4%-6%, dejando a éste permanecer al menos 24 horas. El gel se lava en agua para eliminar los agentes de gelificación libres residuales (tanto 23RGD como etanol), añadiendo disolución salina al gel como fase vehicular y desarrollando una suspensión homogénea. La viscosidad/inyectabilidad de la suspensión se personaliza mediante la manipulación de la concentración del gel, tamaño de partícula y contenido salino, moliendo el gel hasta un tamaño de partícula deseado que hace que el gel sea inyectable a través de una aguja (por ejemplo, una aguja 30g), cargando el gel en una jeringa y esterilizando el gel con irradiación gamma.
- 35 En otro aspecto, la formulación inyectable incluye un gel que comprende fibroína de seda sustancialmente desprovista de sericina y un péptido anfílico y una fase vehicular, en la que la formulación, después de la inyección, permanece sustancialmente en el sitio de inyección durante aproximadamente dos semanas a aproximadamente sesenta meses dependiendo de una aplicación deseada. Por ejemplo, una formulación, para relleno de tejido blando, puede emplear un gel de seda al 1%-6% con vehículo salino al 20%-50% con un tamaño medio de partícula de 20 μ m-30 μ m y puede administrarse a través de una aguja de 26g-30g con ~5N de fuerza mientras permanece sustancialmente durante un mes a nueve meses en el sitio de inyección. Una formulación ejemplar para relleno de tejido duro puede emplear un gel de seda al 6%-10% con un vehículo salino al 0%-25% con un tamaño de partícula de 50 μ m-1.000 μ m y puede administrarse a través de una aguja de 10g-18g con ~5N de fuerza mientras permanece sustancialmente durante nueve a quince meses en el sitio de inyección.
- 40 En una realización, la presente invención proporciona una "cola" peptídica de cinco aminoácidos capaz de unir o conjugar una molécula X a una molécula de seda o fibroína cuando la molécula X está unida a la cola. En una realización, el péptido de la cola comprende residuos de aminoácidos hidrofóbicos y/o apolares. En otra realización, el
- 45
- 50

péptido de la cola comprende residuos de aminoácidos capaces de unión de hidrógeno y/o unión covalente. En otras realizaciones, el péptido de la cola comprende cualquiera de los veinte residuos de aminoácidos estándar convencionales.

5 En una realización, la "cola" peptídica de cinco aminoácidos comprende residuos de aminoácidos que son parte hidrofóbicos (es decir, la parte de la cadena lateral más cercana a la cadena principal de la proteína), por ejemplo, arginina y lisina.

En una realización, la "cola" peptídica de cinco aminoácidos está separada de una molécula X por un péptido espaciador. La longitud del péptido espaciador puede tener una longitud variable.

10 En una realización, la molécula X es cualquier molécula biológica o fragmento de ésta. En otras realizaciones, la molécula X es cualquier compuesto polimérico recombinante, sintético o no nativo. Básicamente, una molécula X es cualquier entidad, natural o sintética, que puede ser útil y puede usarse en el contexto de los hidrogeles de seda.

En una realización, la presente invención proporciona una molécula sintética que tiene la fórmula: (molécula X)_n-(péptido espaciador)₀₋₃₀₀-(cola)-NH₂ para unión con molécula de seda o fibroína, en la que "n" es un número entero que varía de 1-30 y en la que los residuos de aminoácidos del espaciador varían de 0-300.

15 En una realización, la invención proporciona un método para conjugar una molécula X a una molécula de seda o fibroína que comprende mezclar una molécula sintética que tiene la fórmula: (molécula X)_n-(péptido espaciador)₀₋₃₀₀-(cola)-NH₂ con una molécula de seda o fibroína o disolución de seda, en la que "n" es un número entero que varía de 1-30 y en la que los residuos de aminoácidos del espaciador varían de 0-300.

Descripción de los dibujos

20 La Figura 1 ilustra el impacto de 23RGD en los tiempos de gelificación de hidrogeles de seda fabricados en varias circunstancias por ejemplo sin potenciadores o con un potenciador agua/23RGD (Figura 1A) o con un potenciador de etanol o potenciadores combinados etanol-23RGD (Figura 1B). Dependiendo de la proporción de 23RGD a seda usada y los disolventes potenciadores específicos, el péptido puede funcionar como un acelerante o desacelerante del proceso.

25 La Figura 2 es un gráfico de datos de HPLC que ilustra la integración de 23RGD y la estabilidad de su unión a material de gel de seda al 4% preparado con una disolución potenciadora que consiste en una proporción molar 3:1 de 23RGD:seda disuelta en etanol al 90%, agua al 10% cuando se lava múltiples veces en agua ultra-purificada durante varios días. Se muestran los datos para el área total de los picos y para la proporción molar 23RGD:seda calculada tomando como base una curva estándar de 23RGD.

30 La Figura 3 es un gráfico que compara el componente de masa seca del gel a diferentes concentraciones de RGD para geles de seda al 2% (A), geles de seda al 4% (B) y geles al 6% (C). * Las muestras se diferencian significativamente, $p < 0,05$; † la muestra se diferencia significativamente de todas las demás; ‡ todas las muestras se diferencian significativamente.

35 La Figura 4 ilustra el impacto sobre la absorción y retención de agua del hidrogel de seda según se identifica en un ensayo de secado de gel. Los datos se muestran como el porcentaje de masa retenida por una muestra de gel de seda ($n = 4$ para cada tipo) después de ser sometida a un proceso de liofilización de 96 horas. Concentraciones crecientes del potenciador 23RGD causaron un incremento en la masa seca en los materiales del gel más sustancial que la masa del péptido en sí misma. Este fenómeno se debe probablemente a diferencias estructurales en los geles potenciados con 23RGD que no permite un nivel de incorporación de agua igual al de los geles potenciados sólo con etanol.

40 La Figura 5 muestra una comparación del porcentaje de pérdida de masa con el tiempo debida a la bioresorción de las muestras moldeadas por métodos PG y EEG (A), moldeada a partir de concentraciones crecientes de seda (B) y moldeada usando concentraciones crecientes de RGD (C). * Las muestras se diferencian significativamente, $p < 0,05$; † la muestra se diferencia significativamente de todas las demás; ‡ todas las muestras se diferencian significativamente.

45 La Figura 6 ilustra la pérdida de masa húmeda debida a la bioresorción proteolítica de los hidrogeles de seda potenciados con una combinación de 23RGD y etanol a concentraciones crecientes de 23RGD. Como tendencia general, los geles potenciados con 23RGD tienden a ser bioresorbidos más rápidamente tomando como base este ensayo.

50 La Figura 7 es una segunda ilustración del comportamiento de bioresorción de hidrogeles de seda potenciados con 23RGD y no potenciados con 23RGD cuando se incuban en una disolución de proteasa. Este dato de resorción sirve para reforzar la tendencia, ilustrada en la Figura 5, de una velocidad de bioresorción ligeramente más rápida de los hidrogeles potenciados con 23RGD en comparación con los geles no potenciados con 23RGD. La figura también apoya

la eliminación más completa de las conformaciones de hélice α y espiral al azar de los geles potenciados con 23RGD en la Figura 6 durante cuatro días de incubación en proteasa.

La Figura 8 muestra las características estructurales observadas por espectroscopía de Infrarrojos con Transformada de Fourier (FTIR) de dispositivos de hidrogel de fibroína de seda al 4% que son potenciados con etanol solo, y dos potenciadores 23RGD-etanol. Se comparan los espectros totales (Figura 9A) de los materiales y la Banda Amida I ($1.700-1.600\text{ cm}^{-1}$) se resalta para atención particular (Figura 9B) por su relevancia respecto a la estructura secundaria de la proteína. Es específicamente interesante la característica compartida entre todos los geles en su estructura rica en láminas β (1.700 cm^{-1} y 1.622 cm^{-1} respectivamente, resaltado en la Figura 9C y 9E) en todos los puntos de tiempo. Estos picos se vuelven más pronunciados después de la bioresorción y empiezan a diferenciar los materiales potenciados con 23RGD de los materiales potenciados con etanol solo. Esto se pone de manifiesto en los geles potenciados con 23RGD por un desplazamiento del pico a números de onda menores en el pico 1.622 cm^{-1} y la prominencia incrementada dramáticamente del pico 1.700 cm^{-1} . Pueden observarse diferencias adicionales entre los geles bioresorbidos y no bioresorbidos en regiones del espectro que se sabe que se correlacionan con conformaciones de hélice α y espiral al azar (1.654 cm^{-1} y 1.645 cm^{-1} respectivamente resaltados en la Figura 9D). Estas conformaciones son digeridas extensamente en todos los tipos de geles, pero lo más completamente en geles potenciados con 23RGD. Esto sugiere que los geles potenciados con 23RGD tienden a bioresorberse a una estructura secundaria muy rica en láminas β de una manera más rápida que los geles no potenciados con 23RGD. Los espectros mostrados se recogieron en una unidad FTIR Bruker Equinox 55 usando una compilación de 128 escaneos con una resolución de 4 cm^{-1} .

La Figura 9 muestra un espectro FTIR comparativo que ilustra los efectos de diferentes técnicas de gelificación en la estructura proteica del gel antes (Día 0) y después (Día 4) de la bioresorción proteolítica. Los grupos evaluados incluyeron muestras moldeadas por métodos PG y EEG (A), moldeada a partir de concentraciones crecientes de seda (B) y moldeada usando concentraciones crecientes de RGD (C).

La Figura 10 muestra micrográficos representativos de secciones histológicas teñidas con H y E recogidas de geles de seda implantados subcutáneamente en ratas. Las muestras de hidrogel de fibroína de seda al 4% formado por gelificación pasiva (4P), hidrogel de fibroína de seda al 4% formado por gelificación potenciada con etanol (4E) e hidrogel de fibroína de seda al 6% formado por gelificación potenciada con etanol (6E) se compararon a los 7 días (A, B y E, respectivamente) con las muestras 4E y las muestras 6E se compararon de nuevo en los días 28 (C y F) y 57 (D y G).

La Figura 11 muestra fotografías macroscópicas representativas de dispositivos de hidrogel de fibroína de seda al 8% tanto no modificados (A) como potenciados con 23RGD (D) después de una incubación subcutánea de dos semanas en ratas Lewis. También se muestran micrográficos resultantes de las tinciones con H y E de muestras no modificadas (B y C) y acopladas con 23RGD (E y F) con una aumento de 10x y 20x. Estas imágenes macroscópicas acopladas con los micrográficos histológicos proporcionan evidencia de que una respuesta inflamatoria menos extensa durante la integración temprana del dispositivo está asociada con el gel potenciado con 23RGD que con el gel no potenciado con 23RGD.

La Figura 12 muestra histología representativa recogida de un estudio de trece semanas de hidrogel de seda potenciado con 3:1 23RGD al 4% mezclado con salino al 25% (paneles de la izquierda, tinción H y E tinción Tricromo) y ZYPLAST™ (paneles de la derecha, tinción H y E, tinción Tricromo) e inyectado en la intradermis de cobayas. Cada tipo de material presentó alguna evidencia clara de dispositivo implantado en el 75% de sus sitios de implante respectivos. Estos micrográficos indican similitudes fuertes no sólo entre las características de bioresorción a largo plazo sino también la respuesta del tejido huésped a largo plazo entre biomateriales derivados de colágeno y esta formulación de hidrogel de seda potenciada con 23RGD particular.

La Figura 13 muestra micrográficos representativos de secciones histológicas teñidas con H y E recogidas a partir de los explantes del Día 28 de fibroína de seda al 4%, salino al 10% (A); fibroína de seda al 4%, 1:1 23RGD, salino al 10% (B); fibroína de seda al 6%, 1:1 23RGD, salino al 10% (C); ZYPLAST™ (D); fibroína de seda al 4%, salino al 25% (E); fibroína de seda al 4%, 1:1 23RGD, salino al 25% (F); fibroína de seda al 6%, salino al 10% (G); HYLAFORM™ (H); fibroína de seda al 6%, salino al 25% (I); fibroína de seda al 4%, 3:1 23RGD, salino al 25% (J); y fibroína de seda al 6%, 1:1 23RGD, salino al 25% (K).

La Figura 14 muestra micrográficos representativos de secciones histológicas del Día 92 de muestras de fibroína de seda al 4%, 3:1 23RGD, salino al 25% (A-D) y ZYPLAST™ (E-H) teñidas con H y E a 4x (A y E), 10x (B y F), teñidas con Tricromo de Masson a 10x (C y G) y bajo luz polarizada a 10x (D y H).

La Figura 15 es una fotografía de un dispositivo de sujeción personalizado usado conjuntamente con un Instron 8511 (Instron Corporation, Canton MA) conjuntamente con software Series IX y una celda de carga 100 N para caracterizar las fuerzas de inyección asociadas con forzar un gel de seda a través de una aguja 30g.

La Figura 16 ilustra los datos de fuerza de extrusión media del ensayo mecánico de varias formulaciones de gel de seda que ilustra los efectos del cambio del método de pulverización (A), concentración de salino (B), concentración de seda (C) y contenido de RGD (D). Los valores se indican como una media de $n=4$ ensayos a cada velocidad de desplazamiento con la desviación estándar ilustrada como barras de error. * Las muestras se diferencian significativamente, $p<0,05$; † la muestra se diferencia significativamente de todas las demás en el grupo a la misma tasa de deformación; ‡ todas las muestras en el grupo se diferencian significativamente de todas las demás en el grupo a la misma tasa de deformación.

La Figura 17 muestra micrográficos ESEM representativos de precipitados de seda seleccionados inducidos por RGD/etanol generados a partir de las formulaciones mencionadas previamente. Se muestran BASE (A), SCVLO (B), RHI (C), RLO (D), AVHI (E), ECLO (F), AVLO (G), y 3R 6,7:1 (H) con un aumento 200x.

La Figura 18 muestra una comparación de la masa seca total de precipitado recuperado a partir de cada formulación de precipitado de seda ($n=4$ para cada tipo) después de ser sometida a un proceso de liofilización de 96 horas. Los datos se agrupan para comparar los efectos del cambio de la proporción de volumen de acelerante añadido (A), concentración de 23RGD en el acelerante (B), cambio de la concentración inicial de seda (C) y cambio de la concentración de etanol en el acelerante (D). Se mostró que el incremento de cualquiera de estos volúmenes o concentraciones resultaba en cantidades mayores de precipitado, aunque ninguno pareció tener un impacto sustancialmente mayor que el otro. Este fenómeno se debe probablemente a la cinética básica de la reacción de ensamblaje, apareciendo cada reactivo a su vez como un exceso y como limitante dependiendo de la formulación específica. *- diferencia significativa, $p<0,05$; †- El grupo se diferencia significativamente de todos los demás.

La Figura 19 muestra una comparación del porcentaje de masa seca en cada precipitado recuperado ($n=4$ para cada tipo) después de ser sometido a un proceso de liofilización de 96 horas. Los datos se agrupan para comparar los efectos del cambio de la proporción de volumen de acelerante añadido (A), concentración de 23RGD en el acelerante (B), cambio de la concentración inicial de seda (C) y cambio de la concentración de etanol en el acelerante (D). El incremento de la concentración de 23RGD usado incrementó el porcentaje de masa seca de los precipitados, mientras que el incremento del porcentaje de etanol en el acelerante disminuyó la masa seca. Estos cambios pueden surgir de la formación de estructuras de red de gel alteradas causadas por la manipulación de estas variables, probablemente más cristalina en el caso de incrementos de 23RGD y menos cristalina en el caso de incrementos en la concentración de etanol. *- diferencia significativa, $p<0,05$; †- El grupo se diferencia significativamente de todos los demás.

La Figura 20 muestra espectros FTIR representativos de la banda Amida I para precipitados de seda inducidos por 23RGD/etanol inmediatamente después del procesamiento (D0). Los espectros se agrupan para comparar los efectos del cambio de la proporción de volumen de acelerante añadido (A), concentración de 23RGD en el acelerante (B), cambio de la concentración inicial de seda (C) y cambio de la concentración de etanol en el acelerante (D). Estos espectros ilustran que existen similitudes entre todos los grupos aunque el cambio de las concentraciones de 23RGD y las concentraciones de etanol puede influir sustancialmente en la estructura del precipitado. Las concentraciones crecientes de disminuyeron la lámina β observada en un desplazamiento de pico de $\sim 1.621\text{cm}^{-1}$ en RVLO a $\sim 1.624\text{cm}^{-1}$ en RLO. Un incremento adicional en la concentración de 23RGD tanto en BASE como RHI causó esta lámina β debilitada de nuevo junto con valores incrementados de la señal en el intervalo 1.654cm^{-1} y 1.645cm^{-1} , lo que se correlaciona con un contenido incrementado de hélice α y espiral al azar. Un porcentaje incrementado de etanol disminuyó el contenido de hélice α y espiral al azar mostrado por una señal disminuida entre 1.670cm^{-1} y 1.630cm^{-1} en las muestras ECLO y BASE respecto a ECVLO. Esta disminución en hélice α y espiral al azar está acompañada de un incremento en estructura de lámina β . Los descubrimientos respecto a las concentraciones de 23RGD y etanol refuerzan las tendencias observadas en el porcentaje de masa seca de los precipitados, suponiendo que los restos de hélice α y espiral al azar atrapan más agua que las regiones de lámina β .

La Figura 21 es un micrográfico representativo de precipitados de seda inducidos con 23RGD/etanol teñidos con rojo Congo bajo luz polarizada con un aumento 20x. Una ausencia de birrefringencia esmeralda-verde indica un resultado negativo en el ensayo para formación de fibrilla amiloide.

La Figura 22 muestra la comparación de la proporción molar 23RGD:seda en cada uno de los precipitados recuperados. Los datos se agrupan para comparar los efectos del cambio de la proporción de volumen de acelerante añadido (A), concentración de 23RGD en el acelerante (B), cambio de la concentración inicial de seda (C) y cambio de la concentración de etanol en el acelerante (D). Examinando el 23RGD unido a los precipitados, todos los materiales contenían más 23RGD que el predicho por los cálculos iniciales aparte de AVHI, RVLO, RHI y SCVLO. En los casos de AVHI y ECLO, la cantidad de 23RGD fue sustancialmente mayor que la esperada. En los casos de BASE, RLO, SCVLO y SCLO, las cantidades de 23RGD fueron aproximadamente el doble de las esperadas. Esto puede ser indicativo de la formación de un dímero 23RGD en la disolución de acelerante etanol al 90%. Las muestras RVLO se prepararon con una concentración de 23RGD de 0,49 mg/mL en el acelerante, la más baja usada en este estudio y potencialmente en el intervalo de solubilidad de 23RGD en etanol al 90%. Las muestras RLO usaron 1,47 mg/mL y la mayor parte de las

demás formulaciones se prepararon con una concentración de acelerante 23RGD de 2,45 mg/mL, por encima de la concentración de 23RGD a la que la dimerización se vuelve favorable en la disolución. Lo que indica de manera adicional la posibilidad de la dimerización de 23RGD en la disolución de etanol es el comportamiento de la precipitación de ECLO. La concentración de 23RGD permanece 2,45 mg/mL como con BASE y AVLO pero la concentración de agua en el acelerante se incrementa hasta el 20% y resulta en una unión de aproximadamente 1,5 veces la total esperada de 23RGD en lugar de 2 veces. Esto puede deberse a la disolución de una mayor cantidad de 23RGD, lo que causa la coexistencia de 23RGD dimérico y monomérico en disolución reflejado en las proporciones de unión posteriores. *- diferencia significativa, p<0,05; †- El grupo se diferencia significativamente de todos los demás; ‡ Todos los grupos se diferencian significativamente.

La Figura 23 muestra un espectro FTIR representativo de la banda Amida I se muestran para precipitados de seda inducidos con 23RGD/etanol inicialmente (D0) y después de bioresorción proteolítica (D2). Los espectros se agrupan para comparar los efectos del cambio de la proporción de volumen de acelerante añadido (A), concentración de 23RGD en el acelerante (B), cambio de la concentración inicial de seda (C) y cambio de la concentración de etanol en el acelerante (D). La cantidad de acelerante añadido no influye sustancialmente en el comportamiento de bioresorción de los materiales ya que BASE, AVHI y AVLO todos mostraron niveles disminuidos de restos hélice α y espiral al azar. Esta disminución fue ligeramente mayor en el caso de AVLO que también presentó un desplazamiento de pico de 1.624 cm^{-1} a 1.622 cm^{-1} , lo que indica una estructura de lámina β más estable. La concentración de 23RGD tampoco pareció influir en el comportamiento de bioresorción de los materiales ya que RVLO, RLO, BASE y RHI todos mostraron una disminución en los restos de hélice α y espiral al azar, aunque una mayor proporción de hélice α y espiral al azar permaneció intacta en RHI. La concentración de seda no influyó sustancialmente en el comportamiento de bioresorción de los materiales ya que BASE y SCLO presentaron niveles disminuidos de restos hélice α y espiral al azar y presentaron desplazamientos ligeros de pico de 1.624 cm^{-1} a 1.623 cm^{-1} .

Descripción detallada de la invención

Debe entenderse que esta invención no está limitada a la metodología, protocolos y reactivos, etc. particulares descritos en la presente memoria y como tal puede variar. La terminología usada en la presente memoria es sólo para el propósito de describir realizaciones particulares y no se pretende que limite el alcance de la presente invención, que se define solamente por las reivindicaciones.

Tal y como se usa en la presente memoria y en las reivindicaciones, las formas singulares "un", "una" y "el", "la" incluyen la referencia plural a no ser que el contexto indique claramente otra cosa. Así, por ejemplo, la referencia a un péptido es una referencia a uno o más de dichos péptidos, incluyendo equivalentes de éstos conocidos para los expertos en la técnica. Además de en los ejemplos operativos, o cuando se indique otra cosa, todos los números que expresan cantidades de ingredientes o condiciones de reacción usados en la presente memoria deben entenderse como modificados en todos los casos por el término "aproximadamente".

A no ser que se defina otra cosa, todos los términos técnicos y científicos usados en la presente memoria tienen el mismo significado que los entendidos comúnmente por un experto en la técnica a la que pertenece esta invención. Aunque pueden usarse cualesquiera métodos, dispositivos y materiales conocidos en la práctica o ensayo de la invención, los métodos, dispositivos y materiales a este respecto se describen aquí.

Tal y como se usa en la presente memoria, el término "aproximadamente" significa que el elemento, parámetro o término así calificado engloba un intervalo de más o menos el diez por ciento por encima y por debajo del valor del elemento, parámetro o término indicado.

Los aspectos de la presente especificación proporcionan, en parte, una fibroína de seda despolimerizada. Tal y como se usa en la presente memoria, el término "fibroína de seda despolimerizada" es sinónimo de "seda disuelta" y "fibroína de seda disuelta" y se refiere a fibroína de seda que existe principalmente como monómeros u otras unidades oligoméricas inferiores. El tratamiento de la seda fibrosa natural con un agente de disolución, tal como, por ejemplo, un agente caotrópico resulta en fibroína de seda despolimerizada. La fibroína de seda despolimerizada usada para preparar hidrogel de fibroína de seda es un intermedio en el proceso de producción del hidrogel de seda y un precursor directo del material de hidrogel. La fibroína de seda despolimerizada puede prepararse a partir de capullos brutos, seda previamente desgomada o cualquier otra seda parcialmente lavada. Esto también puede incluir material denominado comúnmente como "desecho" del proceso de enrollamiento, es decir, fragmentos cortos de seda bruta o desgomada, con la única precaución de que la seda debe estar sustancialmente limpia de sericina antes de preparar la disolución de fibroína e inducir la formación del gel. Una fuente particular de seda bruta es a partir del gusano de la seda común domesticado *B. mori*, aunque pueden ser apropiadas varias otras fuentes de seda. Estas incluyen otras cepas de *Bombycidae* incluyendo *Antheraea pemyi*, *Antheraea yamamai*, *Antheraea mylitta*, *Antheraea assama*, y *Philosamia cynthia ricini*, así como miembros productores de seda de las familias *Saturnidae*, *Thaumetopoeidae* y miembros

productores de seda del orden *Araneae*. El material también puede obtenerse de otras arañas, orugas o fuentes recombinantes.

5 Los aspectos de la presente especificación proporcionan, en parte, una fibroína de seda polimerizada. Tal y como se usa en la presente memoria el término "fibroína de seda polimerizada" es sinónimo de "fibroína de seda" y se refiere a fibroína de seda que existe principalmente como un polímero. Una fibroína de seda polimerizada o fibroína de seda se prepara, por ejemplo, por un proceso de gelificación descrito en la presente especificación.

10 Los hidrogeles y formulaciones descritos en la presente especificación proporcionan una fibroína de seda despolimerizada y/o fibroína de seda que carece sustancialmente de sericina. Los métodos para realizar la extracción de sericina se han descrito en la Solicitud de Patente U.S. en tramitación No. de Ser. 10/008.924, Publicación No. 20030100108, *Matrix for the production of tissue engineered ligaments, tendons and other tissue*, publicada el 29 de mayo, 2003. Esta solicitud se refiere a fibras de fibroína lavadas hiladas en hilos, usadas para crear una matriz porosa, elástica adecuada como un sustrato para aplicaciones que requieren una resistencia a la tracción muy alta, tal como ligamentos y tendones preparados por bioingeniería.

15 Los extractantes tales como disolución de urea, agua caliente, disoluciones enzimáticas incluyendo papaína entre otras que son conocidos en la técnica para eliminar sericina de fibroína también serían aceptables para la generación de la seda. También pueden usarse métodos mecánicos para la eliminación de sericina de la fibroína de seda. Estos incluyen pero no están limitados a ultrasonidos, fregado abrasivo y flujo de fluidos. El lavado posterior a la extracción se realiza preferiblemente con agitación vigorosa para eliminar sustancialmente cualquier contaminante iónico, restos solubles e insolubles presentes en la seda según se monitoriza mediante microscopía y medidas electroquímicas de la disolución. Un criterio es que el extractante elimina como era de esperar y de manera repetida la cubierta de sericina de la seda usada como fuente sin comprometer significativamente la estructura molecular de la fibroína. Por ejemplo, una extracción puede evaluarse para la eliminación de sericina mediante la pérdida de masa, análisis del contenido de aminoácidos y microscopía electrónica de barrido. La degradación de la fibroína puede monitorizarse a su vez por análisis FTIR, electroforesis en gel de proteínas estándar y microscopía electrónica de barrido.

25 En determinados casos, la seda utilizada para la generación de un hidrogel de seda se ha desprovisto sustancialmente de su contenido de sericina nativo (es decir, $\leq 4\%$ (p/p) de sericina residual en la seda final extraída). Alternativamente, pueden dejarse altas concentraciones de sericina residual en la seda después de la extracción o la etapa de extracción puede omitirse. En aspectos de esta realización, la fibroína de seda desprovista de sericina tiene, por ejemplo, aproximadamente 1% (p/p) de sericina residual, aproximadamente 2% (p/p) de sericina residual, aproximadamente 3% (p/p) de sericina residual o aproximadamente 4% (p/p) de sericina residual. En otros aspectos de esta realización, la fibroína de seda desprovista de sericina tiene, por ejemplo, como máximo 1% (p/p) de sericina residual, como máximo 2% (p/p) de sericina residual, como máximo 3% (p/p) de sericina residual o como máximo 4% (p/p) de sericina residual. En otros aspectos más de esta realización, la fibroína de seda desprovista de sericina tiene, por ejemplo, aproximadamente 1% (p/p) a aproximadamente 2% (p/p) de sericina residual, aproximadamente 1% (p/p) a aproximadamente 3% (p/p) de sericina residual o aproximadamente 1% (p/p) a aproximadamente 4% (p/p) de sericina residual.

40 En determinados casos, la seda utilizada para la generación de un hidrogel de seda carece completamente de su contenido de sericina nativo. Tal y como se usa en la presente memoria, el término "carece completamente (es decir, terminología "que consiste en") significa que en el intervalo de detección del instrumento o proceso usado, la sustancia no puede detectarse o su presencia no puede confirmarse.

En determinados casos, la seda utilizada para la generación de un hidrogel de seda carece esencialmente de su contenido de sericina nativo. Tal y como se usa en la presente memoria, el término "carece esencialmente (o "consiste esencialmente en") significa que sólo pueden detectarse cantidades traza de la sustancia.

45 Además, existe la posibilidad de modificar deliberadamente las propiedades del hidrogel mediante la eliminación parcial controlada de la sericina de la seda o el enriquecimiento deliberado de la seda fuente con sericina. Esto puede servir para mejorar la hidrofiliidad del hidrogel y la eventual aceptación del huésped en entornos biológicos particulares a pesar de la antigenicidad de la sericina.

50 Después del desgomado o eliminación de la sericina inicial de la seda fibrosa usada para la generación de un hidrogel, la seda se lava para eliminar restos de partículas macroscópicas. Es importante eliminar dichas partículas ya que los compuestos solubles o insolubles en disolvente (es decir, disolvente específico de interés para la generación del dispositivo) pueden influir profundamente en el resultado del hidrogel generado a partir de la disolución intermedia. Los compuestos insolubles pueden funcionar como puntos de nucleación, acelerando el fenómeno de gelificación y alterando potencialmente la estructura proteica del hidrogel posterior. Los compuestos solubles también pueden funcionar interactuando con la red de proteínas del hidrogel, alterando el estado organizativo del dispositivo. Cualquiera de estos tipos de compuestos también podría comprometer la biocompatibilidad del dispositivo.

Antes de la disolución, la seda preparada puede someterse a asociación de varias moléculas. La unión entre estos compuestos y las moléculas de seda puede no verse afectada por el agente de disolución usado para la preparación de la disolución intermedia de la seda. El método para acoplar el compuesto modificador a la seda preparada puede variar dependiendo de la naturaleza específica de la unión deseada entre la secuencia de la seda y el modificador. Los métodos no están limitados a pero pueden incluir enlaces de hidrógeno mediante adsorción de afinidad, entrecruzamiento covalente de los compuestos o unión secuencial de compuestos inactivos y activos. Estas moléculas pueden incluir, pero no estarían limitadas a, compuestos inorgánicos, péptidos, proteínas, glicoproteínas, proteoglicanos, compuestos iónicos, polímeros naturales y sintéticos. Dichos péptidos, proteínas, glicoproteínas y proteoglicanos pueden incluir clases de moléculas referidas generalmente como "factores de crecimiento", "citoquinas", "quimioquinas" y "compuestos de la matriz extracelular". Estos compuestos podrían incluir cosas tales como restos de unión de receptor de superficie como arginina-glicina-ácido aspártico (RGD), factores de crecimiento como el factor de crecimiento de fibroblastos básico (bFGF), factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF), factor de crecimiento transformante (TGF), citoquinas como factor de necrosis tumoral (TNF), interferón (IFN), interleuquinas (IL) y secuencias estructurales incluyendo colágeno, elastina, ácido hialurónico y otros. Además, podrían usarse compuestos poliméricos recombinantes, sintéticos o no nativos como decoración incluyendo quitina, ácido poli-láctico (PLA) y ácido poli-glicólico (PGA). Otros compuestos unidos al material pueden incluir clases de moléculas referidas generalmente como trazadores, agentes de contraste, aptámeros, avímeros, ácidos nucleicos peptídicos y recubrimientos de polisacárido modificado.

Por ejemplo, la seda disuelta inicialmente puede generarse por una digestión de 4 horas a 60°C de fibroína de seda pura a una concentración de 200 g/L en una disolución acuosa 9,3 M de bromuro de litio a una concentración de seda del 20% (p/v). Este proceso puede realizarse por otros medios siempre que proporcionen un grado similar de disociación que el proporcionado por una digestión de 4 horas a 60°C de fibroína de seda pura a una concentración de 200 g/L en una disolución acuosa 9,3 M de bromuro de litio. El objetivo principal de esto es crear moléculas de fibroína de seda disociadas de manera uniforme y repetida para asegurar propiedades similares de la disolución de fibroína y, posteriormente, propiedades del dispositivo. Una disolución de seda sustancialmente menos disociada puede tener cinéticas de gelificación alteradas que resultan en propiedades del gel finales diferentes. El grado de disociación puede indicarse por Espectroscopía de Infrarrojos con Transformada de Fourier (FTIR) o difracción de rayos X (XRD) y otras modalidades que miden cuantitativamente y cualitativamente la estructura de proteínas. Además, se puede confirmar que los dominios de cadena pesada y ligera del dímero de fibroína de seda permanecen intactos después del procesamiento y disolución de la seda. Esto puede conseguirse por métodos tales como electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecil-sulfato-sódico (SDS-PAGE) de proteínas estándar que evalúa el peso molecular de los dominios independientes de la fibroína de seda.

Los parámetros del sistema que pueden modificarse en la disolución inicial de la seda incluyen pero no están limitados a tipo de disolvente, concentración de la seda, temperatura, presión y adición de fuerzas mecánicas disruptivas. Los tipos de disolvente además de bromuro de litio acuoso pueden incluir pero no están limitados a disoluciones acuosas disoluciones alcohólicas, 1,1,1,3,3,3-hexafluoro-2-propanol y hexafluoroacetona, 1-butil-3-metilimidazolio. Estos disolventes pueden potenciarse adicionalmente por la adición de urea o especies iónicas incluyendo bromuro de litio, cloruro de calcio, tiocianato de litio, cloruro de cinc, sales de magnesio, tiocianato de sodio y otros haluros de litio y calcio serían útiles para dicha aplicación. Estos disolventes también pueden modificarse mediante el ajuste del pH bien por la adición de compuestos ácidos o básicos.

La personalización adicional del sistema de disolvente puede conseguirse mediante la modificación de la temperatura y presión de la disolución, ya que las condiciones ideales de la disolución variarán por el disolvente seleccionado y los potenciadores añadidos. Los métodos mecánicos de mezclado empleados también pueden variar por el tipo de disolvente y pueden variar desde agitación y mezclado generales a disrupción ultrasónica de los agregados proteicos. Además, la concentración de la seda disuelta resultante puede personalizarse a un intervalo de aproximadamente 1% (p/v) a aproximadamente 30% (p/v). Puede ser posible expandir este intervalo para incluir fracciones mayores de seda disuelta dependiendo del sistema de disolvente específico utilizado. En un ejemplo, después de la disolución inicial de la seda procesada, la proteína de la seda puede dejarse en una disolución acuosa pura al 8% (p/v) de seda. Esto se consigue por la eliminación del sistema de disolvente residual mientras se asegura simultáneamente que el componente acuoso de la disolución de la seda no se elimina nunca completamente ni se compromete. En una situación que implica una disolución inicial de 200 g/L de seda en una disolución acuosa 9,3 M de bromuro de litio, este objetivo se consigue por una etapa de diálisis.

En aspectos de esta realización, la fibroína de seda despolimerizada (fibroína de seda disuelta) tiene una concentración, por ejemplo, de aproximadamente 1% (p/v), aproximadamente 2% (p/v), aproximadamente 3% (p/v), aproximadamente 4% (p/v), aproximadamente 5% (p/v), aproximadamente 6% (p/v), aproximadamente 7% (p/v), aproximadamente 8% (p/v), aproximadamente 9% (p/v), aproximadamente 10% (p/v), aproximadamente 12% (p/v), aproximadamente 15% (p/v), aproximadamente 18% (p/v), aproximadamente 20% (p/v), aproximadamente 25% (p/v) o aproximadamente 30% (p/v). En otros aspectos de esta realización, la fibroína de seda despolimerizada (fibroína de seda disuelta) tiene una

concentración, por ejemplo, de al menos 1% (p/v), al menos 2% (p/v), al menos 3% (p/v), al menos 4% (p/v), al menos 5% (p/v), al menos 6% (p/v), al menos 7% (p/v), al menos 8% (p/v), al menos 9% (p/v), al menos 10% (p/v), al menos 12% (p/v), al menos 15% (p/v), al menos 18% (p/v), al menos 20% (p/v), al menos 25% (p/v) o al menos 30% (p/v). En otros aspectos más de esta realización, la fibroína de seda despolimerizada (fibroína de seda disuelta) tiene una concentración, por ejemplo, de aproximadamente 1% (p/v) a aproximadamente 5% (p/v), aproximadamente 1% (p/v) a aproximadamente 10% (p/v), aproximadamente 1% (p/v) a aproximadamente 15% (p/v), aproximadamente 1% (p/v) a aproximadamente 20% (p/v), aproximadamente 1% (p/v) a aproximadamente 25% (p/v), aproximadamente 1% (p/v) a aproximadamente 30% (p/v), aproximadamente 5% (p/v) a aproximadamente 10% (p/v), aproximadamente 5% (p/v) a aproximadamente 15% (p/v), aproximadamente 5% (p/v) a aproximadamente 20% (p/v), aproximadamente 5% (p/v) a aproximadamente 25% (p/v), aproximadamente 5% (p/v) a aproximadamente 30% (p/v), aproximadamente 10% (p/v) a aproximadamente 15% (p/v), aproximadamente 10% (p/v) a aproximadamente 20% (p/v), aproximadamente 10% (p/v) a aproximadamente 25% (p/v) o aproximadamente 10% (p/v) a aproximadamente 30% (p/v).

Las condiciones de diálisis ejemplares incluyen casetes de diálisis con un volumen de muestra de 3 mL-12 mL con membranas de celulosa con un punto de corte de peso molecular de 3,5 kD dializadas durante tres días frente a agua ultra-pura con una serie de seis cambios a intervalos regulares mientras se agita constantemente. Cada casete, tamaño del cartucho 5 mL-12 mL, puede cambiarse (por ejemplo mediante una jeringa de 20 mL) con 12 mL de una disolución al 20% de seda disuelta en 9,3 M de bromuro de litio mediante una aguja de calibre 18. La disolución de seda resultante puede ser $8\% \pm 0,5\%$ (p/v). La disolución de la seda puede almacenarse a un intervalo de -80°C a 37°C , tal como 4°C antes del uso. Un método es dializar la disolución frente a agua usando una membrana de celulosa con un punto de corte de peso molecular de 3,5 kD, por ejemplo, a un cartucho de 12 mL por 1 L de agua en un vaso de precipitados de 4 L con agitación durante 48 horas ó 72 horas. El agua puede cambiarse varias veces durante la diálisis, por ejemplo, a 1 hora, 4 horas, 12 horas, 24 horas y 36 horas (seis lavados en total). En otras realizaciones, esta membrana puede tener la forma de un casete, tubo u otra membrana semi-permeable cualquiera en un sistema discontinuo, semi-continuo o continuo. Si se desea, la concentración de la seda en disolución puede elevarse después de la etapa de diálisis original por la inclusión de una segunda diálisis frente a un polímero higroscópico tal como PEG, un poli(etilen óxido) o amilasa.

Los parámetros aplicados a la etapa de diálisis pueden alterarse según las necesidades o requerimientos específicos del sistema de disolución particular implicado. Aunque puede no ser deseable cambiar la composición o tamaño de poro de la membrana con el interés de mantener la eficacia del proceso, sería posible cambiar la estructuración de la barrera de diálisis, ya que sería suficiente un tubo de diálisis o cualquier membrana semi-permeable grande con una construcción similar. Además, debe considerarse que cualquier alteración en la naturaleza de la interfase física de la diálisis entre la disolución y el tampón podría alterar las velocidades de flujo iónico y crear de esta manera condiciones de límite localizadas en la membrana que podrían influir en la diálisis de la disolución y las cinéticas de velocidad de gelificación. La duración y relaciones de volumen asociadas con este proceso de diálisis también deben personalizarse para cualquier sistema nuevo y la eliminación de la fase de disolvente debe asegurarse después de la purificación antes de continuar.

También es posible cambiar la fase de tampón en el sistema de diálisis, alterar la pureza del agua o añadir polímeros higroscópicos para eliminar simultáneamente iones y agua de la disolución de seda inicial. Por ejemplo, si es necesario, la disolución de seda puede concentrarse por diálisis frente a un polímero higroscópico, por ejemplo, PEG, un óxido de polietileno o amilasa. El aparato usado para la diálisis puede ser casetes, tubos o cualquier otra membrana semi-permeable.

Los restos insolubles pueden eliminarse de la disolución de seda dializada por centrifugación o filtración. Por ejemplo, la seda dializada puede quitarse del casete con una aguja y jeringa (por ejemplo, una aguja de 18g en una jeringa de 20 mL) y ponerse en un tubo de centrifuga limpio con un volumen suficiente (por ejemplo, 40 mL). La centrifuga puede funcionar a una fuerza centrífuga relativa (RCF) de 30.000 g durante 30 minutos a 4°C . El sobrenadante resultante puede recogerse y centrifugarse de nuevo en condiciones idénticas y el sobrenadante remanente puede recogerse (por ejemplo, en un tubo de ensayo de 50 mL) y almacenarse a 4°C . La disolución de seda también puede evaluarse mediante espectroscopía fotoelectrónica de rayos X (para comprobar el residuo de bromuro de litio) y masa seca (para comprobar la disolución para masa de proteína seca, concentración p/v).

Además, dependiendo del disolvente de la seda inicial, podría ser deseable eliminar partes de la fase de seda o de la fase de disolvente de la disolución mediante una separación por columna de afinidad. Esto podría ser útil uniendo selectivamente moléculas de disolvente específicas o moléculas de soluto específicas para ser eluidas después en un nuevo disolvente.

También existe la posibilidad de una liofilización de la fibroína de seda despolimerizada (seda disuelta) seguido de una etapa de reconstitución. Esto sería muy útil en un caso en el que no se espera que la eliminación de un disolvente deje ningún residuo.

En el caso de una disolución liofilizada, bien usada como una etapa de purificación o como un procedimiento posterior a la purificación, el tipo de disolvente usado para la reconstitución podría personalizarse para el proceso en cuestión. Los disolventes deseables podrían incluir pero no están limitados a disoluciones alcohólicas acuosas, disoluciones acuosas con pH alterado y varias disoluciones orgánicas. Estos disolventes pueden seleccionarse tomando como base varios parámetros que pueden incluir pero no están limitados a una velocidad de gelificación aumentada, estructura cristalina del gel alterada, vida media a temperatura ambiente de la disolución intermedia alterada, solubilidad de la seda alterada y capacidad de interactuar con el medio del entorno tal como temperatura y humedad.

En determinadas realizaciones, un hidrogel de seda se prepara a partir de una disolución de fibroína de seda disuelta que usa un agente para potenciar la gelificación y un agente para mejorar la biocompatibilidad del gel. En algunos casos, el mismo agente potencia la gelificación y mejora la biocompatibilidad. Un agente ejemplar que mejora la biocompatibilidad del gel y funciona como un potenciador de la gelificación es un péptido anfílico que se une a las moléculas de seda mediante interacciones hidrofóbicas, tal como, por ejemplo, un péptido que contiene un resto RGD como 23RGD. En otros casos, diferentes agentes sirven para estos propósitos. Un ejemplo de un agente que sirve como un potenciador de la gelificación es un alcohol, tal como, por ejemplo, etanol, metanol e isopropanol; glicerol; y acetona.

Respecto a los potenciadores de la gelificación, para acelerar el fenómeno de la gelificación de la seda, puede mezclarse una disolución de fibroína de seda despolimerizada (disolución de seda disuelta) con alcohol puro o disolución alcohólica acuosa a proporciones de volumen variadas acompañado de mezclado, bien mediante agitación, revolviendo o cualquier otra forma de agitación. Esta disolución alcohólica potenciadora puede tener una cantidad de un péptido anfílico añadida como un potenciador adicional del resultado final del gel. El grado de aceleración puede subirse o bajarse mediante la adición de un componente potenciador mayor o menor al sistema.

Además de los orgánicos, la velocidad de gelificación puede potenciarse incrementando la concentración de la fibroína de seda despolimerizada (seda disuelta). Esto se hace por métodos que incluyen pero no están limitados a diálisis de la disolución de seda intermedia frente a un tampón que incorpora una especie higroscópica tal como polietilén glicol, una etapa de liofilización y una etapa de evaporación. También puede usarse una temperatura incrementada como un potenciador del proceso de gelificación. Además de esto, la manipulación del pH de la disolución de seda intermedia por métodos que incluyen pero no están limitados a titulación directa e intercambio de gases puede usarse para potenciar el proceso de gelificación. La introducción de especies iónicas seleccionadas incluyendo calcio y potasio en particular también puede usarse para acelerar la velocidad de gelificación.

Los agentes nucleantes incluyendo especies orgánicas e inorgánicas, tanto solubles como insolubles en una disolución de seda acuosa intermedia pueden usarse para potenciar el proceso de gelificación. Éstos pueden incluir pero no están limitados a, secuencias peptídicas que se unen a las moléculas de seda, seda previamente gelificada, y estructuras ricas en láminas β poco solubles. Un medio adicional para acelerar el proceso de gelificación es mediante la introducción de excitación mecánica. Esto podría impartirse mediante un dispositivo de cizalla, dispositivo de ultrasonidos o mezclador mecánico. Debe tenerse en cuenta que cualquiera de estos factores podría usarse posiblemente conjuntamente con cualquier otro o grupo de otros y que el régimen necesitaría personalizarse al resultado deseado.

El tiempo necesario para la gelificación completa de la disolución de seda puede variar desde segundos a horas o días, dependiendo de los valores de los parámetros mencionados anteriormente así como del estado inicial de agregación y organización encontrado en la disolución de la seda (Figura 1). La fracción de volumen del potenciador añadido puede variar desde aproximadamente 0% a aproximadamente 99% del volumen total del sistema (es decir, cada componente puede añadirse en un gran exceso respecto al otro o en cualquier concentración relativa en el intervalo). La concentración de la disolución de la seda usada puede variar desde aproximadamente 1% (p/v) a aproximadamente 20% (p/v). El potenciador puede añadirse a la disolución de la seda o la disolución de la seda puede añadirse al potenciador. El hidrogel de seda formado puede entrecruzarse químicamente o físicamente adicionalmente para obtener propiedades mecánicas alteradas.

En aspectos de esta realización, se añade una disolución del potenciador a una disolución de fibroína de seda despolimerizada (fibroína de seda disuelta), teniendo la disolución de fibroína de seda despolimerizada una concentración de fibroína de seda despolimerizada, por ejemplo, de aproximadamente 1% (p/v), aproximadamente 2% (p/v), aproximadamente 3% (p/v), aproximadamente 4% (p/v), aproximadamente 5% (p/v), aproximadamente 6% (p/v), aproximadamente 7% (p/v), aproximadamente 8% (p/v), aproximadamente 9% (p/v), aproximadamente 10% (p/v), aproximadamente 12% (p/v), aproximadamente 15% (p/v), aproximadamente 18% (p/v), aproximadamente 20% (p/v), aproximadamente 25% (p/v) o aproximadamente 30% (p/v). En otros aspectos de esta realización, se añade una disolución del potenciador a una disolución de fibroína de seda despolimerizada (fibroína de seda disuelta), teniendo la disolución de fibroína de seda despolimerizada una concentración de fibroína de seda despolimerizada, por ejemplo, de al menos 1% (p/v), al menos 2% (p/v), al menos 3% (p/v), al menos 4% (p/v), al menos 5% (p/v), al menos 6% (p/v), al menos 7% (p/v), al menos 8% (p/v), al menos 9% (p/v), al menos 10% (p/v), al menos 12% (p/v), al menos 15% (p/v), al menos 18% (p/v), al menos 20% (p/v), al menos 25% (p/v) o al menos 30% (p/v). En otros aspectos más de esta

realización, se añade una disolución del potenciador a una disolución de fibroína de seda despolimerizada (fibroína de seda disuelta), teniendo la disolución de fibroína de seda despolimerizada una concentración de fibroína de seda despolimerizada, por ejemplo, de aproximadamente 1% (p/v) a aproximadamente 5% (p/v), aproximadamente 1% (p/v) a aproximadamente 10% (p/v), aproximadamente 1% (p/v) a aproximadamente 15% (p/v), aproximadamente 1% (p/v) a aproximadamente 20% (p/v), aproximadamente 1% (p/v) a aproximadamente 25% (p/v), aproximadamente 1% (p/v) a aproximadamente 30% (p/v), aproximadamente 5% (p/v) a aproximadamente 10% (p/v), aproximadamente 5% (p/v) a aproximadamente 15% (p/v), aproximadamente 5% (p/v) a aproximadamente 20% (p/v), aproximadamente 5% (p/v) a aproximadamente 25% (p/v), aproximadamente 5% (p/v) a aproximadamente 30% (p/v), aproximadamente 10% (p/v) a aproximadamente 15% (p/v), aproximadamente 10% (p/v) a aproximadamente 20% (p/v), aproximadamente 10% (p/v) a aproximadamente 25% (p/v) o aproximadamente 10% (p/v) a aproximadamente 30% (p/v).

Un aspecto adicional de algunas realizaciones se refiere a la inclusión de un péptido en la disolución de fibroína de seda. Los ejemplos de dichos péptidos incluyen péptidos anfílicos. Las moléculas anfílicas poseen propiedades tanto hidrofílicas como hidrofóbicas. Muchas otras moléculas anfílicas interaccionan fuertemente con las membranas biológicas por inserción de la parte hidrofóbica en la membrana lipídica, mientras se expone la parte hidrofílica al entorno acuoso. Las realizaciones particulares de hidrogeles incluyen fibroína de seda, fibroína de seda con 23RGD, fibroína de seda con alcohol y 23RGD y fibroína de seda con alcohol, 23RGD y salino/PBS. La cantidad, proporción relativa y secuencia de la adición de los componentes cambiará según el requerimiento específico para el dispositivo.

Además, un péptido anfílico puede acelerar el fenómeno de la gelificación de la seda en determinadas circunstancias. Dicho gel puede producirse mediante la combinación de disolución de fibroína de seda disuelta y una disolución de potenciador de péptido anfílico en alcohol con la concentración de seda varía desde aproximadamente 1% (p/v) a aproximadamente 20% (p/v), la concentración de péptido anfílico varía desde aproximadamente 1:100 a 100:1 moles de 23RGD:moles de seda y la concentración de alcohol varía desde aproximadamente 1% (v/v) a aproximadamente 99% (v/v) antes de la eliminación. Así, por ejemplo, un gel de seda particular se produce mediante el contacto directo entre una disolución acuosa de fibroína de seda despolimerizada y una disolución de potenciador que comprende 23RGD en etanol. Por ejemplo, la disolución de seda disuelta puede mezclarse con un 23RGD suspendido en etanol puro o disolución acuosa de etanol a proporciones de volumen variadas acompañado de mezclado, bien mediante agitación, revolviendo o cualquier otra forma de agitación.

Más específicamente, como un ejemplo no limitativo, para infundir el hidrogel de fibroína de seda con 23RGD, el 23RGD se disuelve primero en una disolución de etanol y agua (por ejemplo, etanol al 90% en agua purificada) en una cantidad para generar las concentraciones de seda y 23RGD planeadas del gel final y se mezcla (por ejemplo, por agitación con vórtex hasta que no hay partículas visibles de 23RGD). Esta disolución se mezcla con disolución de seda disuelta (por ejemplo, pipeteando rápidamente durante 1-2 segundos). Se puede dejar la mezcla gelificante cubierta en condiciones ambientes durante un periodo adecuado, por ejemplo, 24 horas (ó 24 horas después de que el gel haya solidificado dependiendo de las condiciones del potenciador).

La cantidad de tiempo requerida para que las disoluciones de seda disuelta gelifiquen puede variar desde segundos a horas o días, dependiendo de la proporción de volumen de la disolución de seda y volumen de la disolución de potenciador, concentración de fibroína de seda disuelta, concentración de la disolución de potenciador, tipo de potenciador y concentración del péptido anfílico. El péptido anfílico puede mezclarse en la disolución de seda disuelta de varias maneras, por ejemplo, el péptido anfílico disuelto en agua puede añadirse a una disolución de seda disuelta para formar un gel; un péptido anfílico puede añadirse a agua, mezclarse con un alcohol y añadirse a una disolución de seda disuelta; o un péptido anfílico puede añadirse a un hidrogel de fibroína de seda. La proporción molar de péptido anfílico:fibroína de seda puede variar desde 100 a 0,01, la concentración de disolución de seda disuelta puede ser desde aproximadamente 1% a aproximadamente 20%.

Un ejemplo de un péptido anfílico es un péptido 23RGD que tiene la secuencia de aminoácidos: HOOC-Gly-Arg-Gly-Asp-Ile-Pro-Ala-Ser-Ser-Lys-Gly-Gly-Gly-Gly-Ser-Arg-Leu-Leu-Leu-Leu-Leu-Arg-NH₂ (abreviado HOOC-GRGDIPASSKG₄SRL₆R-NH₂) (SEQ ID NO: 1). Opcionalmente, cada uno de los residuos de arginina puede estar en la forma D, lo que puede estabilizar la unión de RG a proteasas de serina. Además, el extremo COO puede estar acilado para bloquear la proteólisis. Este 23RGD ejemplar tiene la secuencia de aminoácidos Ac-GdRGDIPASSKG₄SdRL_{6d}R-NH₂ (SEQ ID NO: 2). Puede ser ventajoso incluir un dominio espaciador en el péptido RGD, por ejemplo, un péptido tal como SG₄KSSAP (SEQ ID NO: 3) puede presentar el RGD en la superficie del biomaterial de seda separando óptimamente el dominio de unión a células de la secuencia de unión en el extremo del péptido. Las colas de leucina opcionales de este ejemplo pueden interaccionar de una manera análoga a una cremallera de leucina y estar dirigidas por la entropía de una disolución acuosa para formar una aproximación de una película Langmuir-Blodgett (LB) monomolecular en la superficie de materiales expuestos a dichas disoluciones, presentando así una "alfombra" de sitios de unión de RGD en estas superficies.

Pueden usarse otras proteínas o péptidos en lugar de 23RGD si dichas proteínas o péptidos tienen las características deseadas. Las características ejemplares incluyen dominios hidrofílicos que pueden interferir/potenciar/influir en la gelificación de la seda, y/o dominios de unión a células que pueden potenciar la adhesión, diseminación y migración celulares, tales como RGD, KQAGDV (SEQ ID NO: 4), PHSRN (SEQ ID NO: 5), YIGSR (SEQ ID NO: 6), CDPGYIGSR (SEQ ID NO: 7), IKVAV (SEQ ID NO: 8), RNIAEIIKDI (SEQ ID NO: 9), YFQRYLI (SEQ ID NO: 10), PDSGR (SEQ ID NO: 11), FHRIKA (SEQ ID NO: 12), PRRARV (SEQ ID NO: 13) y WQPPRARI (SEQ ID NO: 14). Véase Hersel et al., 24 Biomaterials 4285-415 (2003).

En aspectos de esta realización, un hidrogel comprende una proporción molar de péptido anfílico a fibroína de seda, por ejemplo, de aproximadamente 100:1, aproximadamente 90:1, aproximadamente 80:1, aproximadamente 70:1, aproximadamente 60:1, aproximadamente 50:1, aproximadamente 40:1, aproximadamente 30:1, aproximadamente 20:1, aproximadamente 10:1, aproximadamente 7:1, aproximadamente 5:1, aproximadamente 3:1, aproximadamente 1:1, aproximadamente 1:3, aproximadamente 1:5, aproximadamente 1:7, aproximadamente 1:10, aproximadamente 1:20, aproximadamente 1:30, aproximadamente 1:40, aproximadamente 1:50, aproximadamente 1:60, aproximadamente 1:70, aproximadamente 1:80, o aproximadamente 1:90 o aproximadamente 1:100. En otros aspectos de esta realización, un hidrogel comprende una proporción molar de péptido anfílico a fibroína de seda, por ejemplo, de al menos 100:1, al menos 90:1, al menos 80:1, al menos 70:1, al menos 60:1, al menos 50:1, al menos 40:1, al menos 30:1, al menos 20:1, al menos 10:1, al menos 7:1, al menos 5:1, al menos 3:1, al menos 1:1, al menos 1:3, al menos 1:5, al menos 1:7, al menos 1:10, al menos 1:20, al menos 1:30, al menos 1:40, al menos 1:50, al menos 1:60, al menos 1:70, al menos 1:80, o al menos 1:90 o al menos 1:100. En otros aspectos adicionales de esta realización, un hidrogel comprende una proporción molar de péptido anfílico a fibroína de seda, por ejemplo, de como máximo 100:1, como máximo 90:1, como máximo 80:1, como máximo 70:1, como máximo 60:1, como máximo 50:1, como máximo 40:1, como máximo 30:1, como máximo 20:1, como máximo 10:1, como máximo 7:1, como máximo 5:1, como máximo 3:1, como máximo 1:1, como máximo 1:3, como máximo 1:5, como máximo 1:7, como máximo 1:10, como máximo 1:20, como máximo 1:30, como máximo 1:40, como máximo 1:50, como máximo 1:60, como máximo 1:70, como máximo 1:80, o como máximo 1:90 o como máximo 1:100. En otros aspectos más de esta realización, un hidrogel comprende una proporción molar de péptido anfílico a fibroína de seda, por ejemplo, de aproximadamente 100:1 a aproximadamente 1:100; aproximadamente 90:1 a aproximadamente 1:90; aproximadamente 80:1 a aproximadamente 1:80; aproximadamente 70:1 a aproximadamente 1:70; aproximadamente 60:1 a aproximadamente 1:60; aproximadamente 50:1 a aproximadamente 1:50; aproximadamente 40:1 a aproximadamente 1:40; aproximadamente 30:1 a aproximadamente 1:30; aproximadamente 20:1 a aproximadamente 1:20; aproximadamente 10:1 a aproximadamente 1:10; aproximadamente 7:1 a aproximadamente 1:7; aproximadamente 5:1 a aproximadamente 1:5; o aproximadamente 3:1 a aproximadamente 1:3.

El uso de un péptido anfílico no sólo altera las características estructurales proteicas de la proteína fibroína de seda, sino que al hacer esto altera su resistencia a la bioresorción proteolítica *in vitro*. Estas alteraciones en la resistencia a la bioresorción proteolítica surgen de aspectos de la alteración de la estructura de la proteína ya que se piensa típicamente que la hélice α y el espiral al azar son menos estables y por lo tanto más susceptibles a la bioresorción proteolítica que las regiones de lámina β de la seda. Las regiones con giros β y cadenas β del hidrogel descrito en la presente especificación son más resistentes a la bioresorción proteolítica a diferencia de las regiones de hélices α y espirales al azar. Mediante la manipulación deliberada de esta estructura proteica mediante la concentración controlada de la disolución y la adición de factores potenciadores (tipo, concentración y gradiente director), podrían controlarse las cinéticas de gelificación y las propiedades del gel resultante para proporcionar resultados óptimos en términos de comportamientos de degradación y biológicos resultantes. El impacto de la adición del péptido anfílico al hidrogel de seda en un hidrogel de seda es evidente después del examen de los datos obtenidos mediante estudios de implante realizados *in vivo*, tanto subcutáneamente en ratas como intradérmicamente en la dermis de cobayas. Véase el Ejemplo 10.

En una realización, un hidrogel comprende una proteína fibroína de seda en la que la estructura proteica es resistente a la bioresorción. En aspectos de esta realización, un hidrogel que comprende una fibroína de seda tiene una estructura proteica que hace que el hidrogel sea resistente a la bioresorción, por ejemplo, durante aproximadamente 10 días, aproximadamente 20 días, aproximadamente 30 días, aproximadamente 40 días, aproximadamente 50 días, aproximadamente 60 días, aproximadamente 70 días, aproximadamente 80 días o aproximadamente 90 días. En otros aspectos de esta realización, un hidrogel que comprende una fibroína de seda tiene una estructura proteica que hace que el hidrogel sea resistente a la bioresorción, por ejemplo, durante al menos 10 días, al menos 20 días, al menos 30 días, al menos 40 días, al menos 50 días, al menos 60 días, al menos 70 días, al menos 80 días o al menos 90 días. En otros aspectos adicionales aspectos de esta realización, un hidrogel que comprende una fibroína de seda tiene una estructura proteica que hace que el hidrogel sea resistente a la bioresorción, por ejemplo, durante aproximadamente 10 días a aproximadamente 30 días, aproximadamente 20 días a aproximadamente 50 días, aproximadamente 40 días a aproximadamente 60 días, aproximadamente 50 días a aproximadamente 80 días o aproximadamente 60 días a aproximadamente 90 días.

En otra realización, un hidrogel que comprende una fibroína de seda y un péptido anfílico tiene una estructura proteica que hace que el hidrogel sea resistente a la bioresorción. En aspectos de esta realización, un hidrogel que comprende una fibroína de seda y un péptido anfílico tiene una estructura proteica que hace que el hidrogel sea resistente a la bioresorción, por ejemplo, durante aproximadamente 10 días, aproximadamente 20 días, aproximadamente 30 días, aproximadamente 40 días, aproximadamente 50 días, aproximadamente 60 días, aproximadamente 70 días, aproximadamente 80 días o aproximadamente 90 días. En otros aspectos de esta realización, un hidrogel que comprende una fibroína de seda y un péptido anfílico tiene una estructura proteica que hace que el hidrogel sea resistente a la bioresorción, por ejemplo, durante al menos 10 días, al menos 20 días, al menos 30 días, al menos 40 días, al menos 50 días, al menos 60 días, al menos 70 días, al menos 80 días o al menos 90 días. En otros aspectos adicionales de esta realización, un hidrogel que comprende una fibroína de seda y un péptido anfílico tiene una estructura proteica que hace que el hidrogel sea resistente a la bioresorción, por ejemplo, durante aproximadamente 10 días a aproximadamente 30 días, aproximadamente 20 días a aproximadamente 50 días, aproximadamente 40 días a aproximadamente 60 días, aproximadamente 50 días a aproximadamente 80 días o aproximadamente 60 días a aproximadamente 90 días.

En otra realización más, un hidrogel que comprende una fibroína de seda tiene una estructura proteica que incluye sustancialmente regiones de giro β y cadena β . En aspectos de esta realización, un hidrogel que comprende una fibroína de seda y un péptido anfílico tiene una estructura proteica que incluye, por ejemplo, aproximadamente 10% de regiones de giro β y cadena β , aproximadamente 20% de regiones de giro β y cadena β , aproximadamente 30% de regiones de giro β y cadena β , aproximadamente 40% de regiones de giro β y cadena β , aproximadamente 50% de regiones de giro β y cadena β , aproximadamente 60% de regiones de giro β y cadena β , aproximadamente 70% de regiones de giro β y cadena β , aproximadamente 80% de regiones de giro β y cadena β , aproximadamente 90% de regiones de giro β y cadena β o aproximadamente 100% de regiones de giro β y cadena β . En otros aspectos de esta realización, un hidrogel que comprende una fibroína de seda tiene una estructura proteica que incluye, por ejemplo, al menos 10% de regiones de giro β y cadena β , al menos 20% de regiones de giro β y cadena β , al menos 30% de regiones de giro β y cadena β , al menos 40% de regiones de giro β y cadena β , al menos 50% de regiones de giro β y cadena β , al menos 60% de regiones de giro β y cadena β , al menos 70% de regiones de giro β y cadena β , al menos 80% de regiones de giro β y cadena β , al menos 90% de regiones de giro β y cadena β o al menos 95% de regiones de giro β y cadena β . En otros aspectos más de esta realización, un hidrogel que comprende una fibroína de seda tiene una estructura proteica que incluye, por ejemplo, aproximadamente 10% a aproximadamente 30% de regiones de giro β y cadena β , aproximadamente 20% a aproximadamente 40% de regiones de giro β y cadena β , aproximadamente 30% a aproximadamente 50% de regiones de giro β y cadena β , aproximadamente 40% a aproximadamente 60% de regiones de giro β y cadena β , aproximadamente 50% a aproximadamente 70% de regiones de giro β y cadena β , aproximadamente 60% a aproximadamente 80% de regiones de giro β y cadena β , aproximadamente 70% a aproximadamente 90% de regiones de giro β y cadena β , aproximadamente 80% a aproximadamente 100% de regiones de giro β y cadena β , aproximadamente 10% a aproximadamente 40% de regiones de giro β y cadena β , aproximadamente 30% a aproximadamente 60% de regiones de giro β y cadena β , aproximadamente 50% a aproximadamente 80% de regiones de giro β y cadena β , aproximadamente 70% a aproximadamente 100% de regiones de giro β y cadena β , aproximadamente 40% a aproximadamente 80% de regiones de giro β y cadena β , aproximadamente 50% a aproximadamente 90% de regiones de giro β y cadena β , aproximadamente 60% a aproximadamente 100% de regiones de giro β y cadena β , o aproximadamente 50% a aproximadamente 100% de regiones de giro β y cadena β .

En otra realización más, un hidrogel que comprende una fibroína de seda y un péptido anfílico tiene una estructura proteica que carece sustancialmente de regiones de hélice α y espiral al azar. En aspectos de esta realización, un hidrogel que comprende una fibroína de seda tiene una estructura proteica que incluye, por ejemplo, aproximadamente 5% de regiones de hélice α y espiral al azar, aproximadamente 10% de regiones de hélice α y espiral al azar, aproximadamente 15% de regiones de hélice α y espiral al azar, aproximadamente 20% de regiones de hélice α y espiral al azar, aproximadamente 25% de regiones de hélice α y espiral al azar, aproximadamente 30% de regiones de hélice α y espiral al azar, aproximadamente 35% de regiones de hélice α y espiral al azar, aproximadamente 40% de regiones de hélice α y espiral al azar, aproximadamente 45% de regiones de hélice α y espiral al azar o aproximadamente 50% de regiones de hélice α y espiral al azar. En otros aspectos de esta realización, un hidrogel que comprende una fibroína de seda tiene una estructura proteica que incluye, por ejemplo, como máximo 5% de regiones de hélice α y espiral al azar, como máximo 10% de regiones de hélice α y espiral al azar, como máximo 15% de regiones de hélice α y espiral al azar, como máximo 20% de regiones de hélice α y espiral al azar, como máximo 25% de regiones de hélice α y espiral al azar, como máximo 30% de regiones de hélice α y espiral al azar, como máximo 35% de regiones de hélice α y espiral al azar, como máximo 40% de regiones de hélice α y espiral al azar, como máximo 45% de regiones de hélice α y espiral al azar o como máximo 50% de regiones de hélice α y espiral al azar. En otros aspectos más de esta realización, un hidrogel que comprende una fibroína de seda tiene una estructura proteica que incluye, por ejemplo, aproximadamente 5% a

regiones de hélice α y espiral al azar, aproximadamente 5% a aproximadamente 40% de regiones de hélice α y espiral al azar, aproximadamente 5% a aproximadamente 50% de regiones de hélice α y espiral al azar, aproximadamente 10% a aproximadamente 20% de regiones de hélice α y espiral al azar, aproximadamente 10% a aproximadamente 30% de regiones de hélice α y espiral al azar, aproximadamente 15% a aproximadamente 25% de regiones de hélice α y espiral al azar, aproximadamente 15% a aproximadamente 30% de regiones de hélice α y espiral al azar o aproximadamente 15% a aproximadamente 35% de regiones de hélice α y espiral al azar.

Los aspectos de la presente especificación proporcionan, en parte, un hidrogel de fibroína de seda que tiene una dureza. Dureza se refiere a varias propiedades de un objeto en la fase sólida que le proporcionan alta resistencia a varias clases de cambio de forma cuando se aplica una fuerza. La dureza se mide usando un durómetro y es un valor sin unidades que varía de cero a 100. La capacidad o incapacidad de un hidrogel de ser comprimido fácilmente afectará su idoneidad para aplicación en diferentes funciones de reemplazo de tejidos, es decir, elasticidad mecánica como tejido óseo, graso, conectivo. La dureza también afectará la capacidad de un hidrogel de ser pulverizado eficazmente, siendo la razón que un material duro puede pulverizarse más fácilmente y consistentemente. La dureza también afectará la extrudabilidad, ya que un material blando puede ser capaz más fácilmente de comprimirse ligeramente durante la inyección para empaquetarse con otras partículas o cambiar su forma para pasar a través de un cilindro de jeringa o aguja.

En una realización, un hidrogel de fibroína de seda presenta una dureza baja. En aspectos de esta realización, un hidrogel de fibroína de seda presenta una dureza, por ejemplo, de aproximadamente 5, aproximadamente 10, aproximadamente 15, aproximadamente 20, aproximadamente 25, aproximadamente 30 o aproximadamente 35. En otros aspectos de esta realización, un hidrogel de fibroína de seda presenta una dureza, por ejemplo, de como máximo 5, como máximo 10, como máximo 15, como máximo 20, como máximo 25, como máximo 30 o como máximo 35. En otros aspectos más de esta realización, un hidrogel de fibroína de seda presenta una dureza, por ejemplo, de aproximadamente 5 a aproximadamente 35, aproximadamente 10 a aproximadamente 35, aproximadamente 15 a aproximadamente 35, aproximadamente 20 a aproximadamente 35 o aproximadamente 25 a aproximadamente 35, aproximadamente 5 a aproximadamente 40, aproximadamente 10 a aproximadamente 40, aproximadamente 15 a aproximadamente 40, aproximadamente 20 a aproximadamente 40, aproximadamente 25 a aproximadamente 40 o aproximadamente 30 a aproximadamente 40.

En una realización, un hidrogel de fibroína de seda presenta una dureza media. En aspectos de esta realización, un hidrogel de fibroína de seda presenta una dureza, por ejemplo, de aproximadamente 40, aproximadamente 45, aproximadamente 50, aproximadamente 55 o aproximadamente 60. En otros aspectos de esta realización, un hidrogel de fibroína de seda presenta una dureza, por ejemplo, de al menos 40, al menos 45, al menos 50, al menos 55 o al menos 60. En otros aspectos adicionales de esta realización, un hidrogel de fibroína de seda presenta una dureza, por ejemplo, de como máximo 40, como máximo 45, como máximo 50, como máximo 55 o como máximo 60. En otros aspectos más de esta realización, un hidrogel de fibroína de seda presenta una dureza, por ejemplo, de aproximadamente 35 a aproximadamente 60, aproximadamente 35 a aproximadamente 55, aproximadamente 35 a aproximadamente 50, aproximadamente 35 a aproximadamente 45, aproximadamente 40 a aproximadamente 60, aproximadamente 45 a aproximadamente 60, aproximadamente 50 a aproximadamente 60, aproximadamente 55 a aproximadamente 60, aproximadamente 40 a aproximadamente 65, aproximadamente 45 a aproximadamente 65, aproximadamente 50 a aproximadamente 65, aproximadamente 55 a aproximadamente 65.

En otra realización, un hidrogel de fibroína de seda presenta una dureza alta. En aspectos de esta realización, un hidrogel de fibroína de seda presenta una dureza, por ejemplo, de aproximadamente 65, aproximadamente 70, aproximadamente 75, aproximadamente 80, aproximadamente 85, aproximadamente 90, aproximadamente 95 o aproximadamente 100. En otros aspectos de esta realización, un hidrogel de fibroína de seda presenta una dureza, por ejemplo, de al menos 65, al menos 70, al menos 75, al menos 80, al menos 85, al menos 90, al menos 95 o al menos 100. En otros aspectos más de esta realización, un hidrogel de fibroína de seda presenta una dureza, por ejemplo, de aproximadamente 65 a aproximadamente 100, aproximadamente 70 a aproximadamente 100, aproximadamente 75 a aproximadamente 100, aproximadamente 80 a aproximadamente 100, aproximadamente 85 a aproximadamente 100, aproximadamente 90 a aproximadamente 100, aproximadamente 65 a aproximadamente 75, aproximadamente 65 a aproximadamente 80, aproximadamente 65 a aproximadamente 85, aproximadamente 65 a aproximadamente 90, aproximadamente 65 a aproximadamente 95, aproximadamente 60 a aproximadamente 75, aproximadamente 60 a aproximadamente 80, aproximadamente 60 a aproximadamente 85, aproximadamente 60 a aproximadamente 90 o aproximadamente 60 a aproximadamente 95.

En una realización, un hidrogel de fibroína de seda presenta una resistencia alta a la deformación. En aspectos de esta realización, un hidrogel de fibroína de seda presenta una resistencia a la deformación, por ejemplo, de aproximadamente 100%, aproximadamente 99%, aproximadamente 98%, aproximadamente 97%, aproximadamente 96%, aproximadamente 95%, aproximadamente 94%, aproximadamente 93%, aproximadamente 92%, aproximadamente 91%, aproximadamente 90%, aproximadamente 89%, aproximadamente 88%, aproximadamente 87%, aproximadamente 86% o aproximadamente 85%. En otros aspectos de esta realización, un hidrogel de fibroína de seda

5 presenta una resistencia a la deformación, por ejemplo, de al menos 99%, al menos 98%, al menos 97%, al menos 96%, al menos 95%, al menos 94%, al menos 93%, al menos 92%, al menos 91%, al menos 90%, al menos 89%, al menos 88%, al menos 87%, al menos 86% o al menos 85%. En otros aspectos más de esta realización, un hidrogel de fibroína de seda presenta una resistencia a la deformación, por ejemplo, de como máximo 99%, como máximo 98%, como máximo 97%, como máximo 96%, como máximo 95%, como máximo 94%, como máximo 93%, como máximo 92%, como máximo 91%, como máximo 90%, como máximo 89%, como máximo 88%, como máximo 87%, como máximo 86% o como máximo 85%. En otros aspectos adicionales de esta realización, un hidrogel de fibroína de seda presenta una resistencia a la deformación, por ejemplo, de aproximadamente 85% a aproximadamente 100%, aproximadamente 87% a aproximadamente 100%, aproximadamente 90% a aproximadamente 100%, aproximadamente 93% a aproximadamente 100%, aproximadamente 95% a aproximadamente 100% o aproximadamente 97% a aproximadamente 100%.

15 Un hidrogel de fibroína de seda presenta un módulo elástico. Módulo elástico, o módulo de elasticidad, se refiere a la capacidad de un material de hidrogel de resistir la deformación, o, al contrario, la tendencia de un objeto a ser deformado no permanentemente cuando se le aplica una fuerza. El módulo elástico de un objeto se define como la pendiente de su curva esfuerzo-deformación en la región de deformación elástica: $\lambda = \text{esfuerzo/deformación}$, donde λ es el módulo elástico en Pascuales; esfuerzo es la fuerza que causa la deformación dividida por el área a la que se aplica la fuerza; y deformación es la proporción del cambio causado por el esfuerzo respecto al estado original del objeto. La especificación de cómo deben medirse los esfuerzos, incluyendo instrucciones, permite definir muchos tipos de módulos elásticos. Los tres módulos elásticos principales son módulo de tracción, módulo de cizalla y módulo volumétrico.

20 El módulo de tracción (E) o módulo de Young es la respuesta de un objeto a deformación lineal, o la tendencia de un objeto a deformarse a lo largo de un eje cuando se aplican fuerzas opuestas a lo largo de ese eje. Se define como la proporción de esfuerzo de tracción respecto a deformación por tracción. Habitualmente, se refiere simplemente como el módulo elástico. El módulo de cizalla o módulo de rigidez se refiere a la tendencia de un objeto a cizalladura (la deformación de forma a volumen constante) cuando actúan fuerzas opuestas. Se define como esfuerzo de cizalla sobre deformación por cizalla. El módulo de cizalla es parte de la derivación de viscosidad. El módulo de cizalla está relacionado con la deformación de un sólido cuando éste experimenta una fuerza paralela a una de sus superficies mientras su cara opuesta experimenta una fuerza opuesta (tal como fricción). El módulo volumétrico (K) describe elasticidad volumétrica o la resistencia de un objeto a compresión uniforme, y es la tendencia de un objeto a deformarse en todas las direcciones cuando se carga uniformemente en todas las direcciones. Se define como esfuerzo volumétrico sobre deformación volumétrica y es la inversa de la compresibilidad. El módulo volumétrico es una extensión del módulo de Young a tres dimensiones.

35 En otra realización, un hidrogel de fibroína de seda presenta un módulo de tracción. En aspectos de esta realización, un hidrogel de fibroína de seda presenta un módulo de tracción, por ejemplo, de aproximadamente 1 MPa, aproximadamente 10 MPa, aproximadamente 20 MPa, aproximadamente 30 MPa, aproximadamente 40 MPa, aproximadamente 50 MPa, aproximadamente 60 MPa, aproximadamente 70 MPa, aproximadamente 80 MPa, aproximadamente 90 MPa, aproximadamente 100 MPa, aproximadamente 100 MPa, aproximadamente 200 MPa, aproximadamente 300 MPa, aproximadamente 400 MPa, aproximadamente 500 MPa, aproximadamente 750 MPa, aproximadamente 1 GPa, aproximadamente 5 GPa, aproximadamente 10 GPa, aproximadamente 15 GPa, aproximadamente 20 GPa, aproximadamente 25 GPa o aproximadamente 30 GPa. En otros aspectos de esta realización, un hidrogel de fibroína de seda presenta un módulo de tracción, por ejemplo, de al menos 1 MPa, al menos 10 MPa, al menos 20 MPa, al menos 30 MPa, al menos 40 MPa, al menos 50 MPa, al menos 60 MPa, al menos 70 MPa, al menos 80 MPa, al menos 90 MPa, al menos 100 MPa, al menos 200 MPa, al menos 300 MPa, al menos 400 MPa, al menos 500 MPa, al menos 750 MPa, al menos 1 GPa, al menos 5 GPa, al menos 10 GPa, al menos 15 GPa, al menos 20 GPa, al menos 25 GPa o al menos 30 GPa. En otros aspectos más de esta realización, un hidrogel de fibroína de seda presenta un módulo de tracción, por ejemplo, de aproximadamente 1 MPa a aproximadamente 30 MPa, aproximadamente 10 MPa a aproximadamente 50 MPa, aproximadamente 25 MPa a aproximadamente 75 MPa, aproximadamente 50 MPa a aproximadamente 100 MPa, aproximadamente 100 MPa a aproximadamente 300 MPa, aproximadamente 200 MPa a aproximadamente 400 MPa, aproximadamente 300 MPa a aproximadamente 500 MPa, aproximadamente 100 MPa a aproximadamente 500 MPa, aproximadamente 250 MPa a aproximadamente 750 MPa, aproximadamente 500 MPa a aproximadamente 1 GPa, aproximadamente 1 GPa a aproximadamente 30 GPa, aproximadamente 10 GPa a aproximadamente 30 GPa.

55 En otra realización, un hidrogel de fibroína de seda presenta un módulo de cizalla. En aspectos de esta realización, un hidrogel de fibroína de seda presenta un módulo de cizalla, por ejemplo, de aproximadamente 1 MPa, aproximadamente 10 MPa, aproximadamente 20 MPa, aproximadamente 30 MPa, aproximadamente 40 MPa, aproximadamente 50 MPa, aproximadamente 60 MPa, aproximadamente 70 MPa, aproximadamente 80 MPa, aproximadamente 90 MPa, aproximadamente 100 MPa, aproximadamente 200 MPa, aproximadamente 300 MPa, aproximadamente 400 MPa, aproximadamente 500 MPa, aproximadamente 750 MPa, aproximadamente 1 GPa, aproximadamente 5 GPa, aproximadamente 10 GPa, aproximadamente 15 GPa, aproximadamente 20 GPa, aproximadamente 25 GPa o aproximadamente 30 GPa. En otros aspectos de esta realización, un hidrogel de fibroína de seda presenta un módulo de

cizalla, por ejemplo, de al menos 1 MPa, al menos 10 MPa, al menos 20 MPa, al menos 30 MPa, al menos 40 MPa, al menos 50 MPa, al menos 60 MPa, al menos 70 MPa, al menos 80 MPa, al menos 90 MPa, al menos 100 MPa, al menos 200 MPa, al menos 300 MPa, al menos 400 MPa, al menos 500 MPa, al menos 750 MPa, al menos 1 GPa, al menos 5 GPa, al menos 10 GPa, al menos 15 GPa, al menos 20 GPa, al menos 25 GPa o al menos 30 GPa. En otros aspectos más de esta realización, un hidrogel de fibroína de seda presenta un módulo de cizalla, por ejemplo, de aproximadamente 1 MPa a aproximadamente 30 MPa, aproximadamente 10 MPa a aproximadamente 50 MPa, aproximadamente 25 MPa a aproximadamente 75 MPa, aproximadamente 50 MPa a aproximadamente 100 MPa, aproximadamente 100 MPa a aproximadamente 300 MPa, aproximadamente 200 MPa a aproximadamente 400 MPa, aproximadamente 300 MPa a aproximadamente 500 MPa, aproximadamente 100 MPa a aproximadamente 500 MPa, aproximadamente 250 MPa a aproximadamente 750 MPa, aproximadamente 500 MPa a aproximadamente 1 GPa, aproximadamente 1 GPa a aproximadamente 30 GPa, aproximadamente 10 GPa a aproximadamente 30 GPa.

En otra realización, un hidrogel de fibroína de seda presenta un módulo volumétrico. En aspectos de esta realización, un hidrogel de fibroína de seda presenta un módulo volumétrico, por ejemplo, de aproximadamente 5 GPa, aproximadamente 6 GPa, aproximadamente 7 GPa, aproximadamente 8 GPa, aproximadamente 9 GPa, aproximadamente 10 GPa, aproximadamente 15 GPa, aproximadamente 20 GPa, aproximadamente 25 GPa, aproximadamente 30 GPa, aproximadamente 35 GPa, aproximadamente 40 GPa, aproximadamente 45 GPa, aproximadamente 50 GPa, aproximadamente 60 GPa, aproximadamente 70 GPa, aproximadamente 80 GPa, aproximadamente 90 GPa, aproximadamente 100 GPa. En otros aspectos de esta realización, un hidrogel de fibroína de seda presenta un módulo volumétrico, por ejemplo, de al menos 5 GPa, al menos 6 GPa, al menos 7 GPa, al menos 8 GPa, al menos 9 GPa, al menos 10 GPa, al menos 15 GPa, al menos 20 GPa, al menos 25 GPa, al menos 30 GPa, al menos 35 GPa, al menos 40 GPa, al menos 45 GPa, al menos 50 GPa, al menos 60 GPa, al menos 70 GPa, al menos 80 GPa, al menos 90 GPa, al menos 100 GPa. En otros aspectos más de esta realización, un hidrogel de fibroína de seda presenta un módulo volumétrico, por ejemplo, de aproximadamente 5 GPa a aproximadamente 50 GPa, aproximadamente 5 GPa a aproximadamente 100 GPa, aproximadamente 10 GPa a aproximadamente 50 GPa, aproximadamente 10 GPa a aproximadamente 100 GPa o aproximadamente 50 GPa a aproximadamente 100 GPa.

Un hidrogel de fibroína de seda presenta una resistencia a la tracción alta. La resistencia a la tracción tiene tres puntos de definición diferentes de esfuerzo máximo. Tensión de fluencia se refiere al esfuerzo al que la deformación del material cambia de deformación elástica a deformación plástica, causando que se deforme permanentemente. La resistencia máxima se refiere al esfuerzo máximo que un material puede soportar cuando se somete a tensión, compresión o cizalla. Es el esfuerzo máximo en la curva esfuerzo-deformación. La resistencia a la rotura se refiere a la coordenada de esfuerzo en la curva esfuerzo-deformación en el punto de rotura, o cuando el material se desarma.

En otra realización, un hidrogel de fibroína de seda presenta una tensión de fluencia alta respecto a otras clases de polímeros. En aspectos de esta realización, una matriz de elastómero que define una formación de poros interconectados presenta una tensión de fluencia, por ejemplo, de aproximadamente 0,1 MPa, aproximadamente 0,5 MPa, aproximadamente 1 MPa, aproximadamente 5 MPa, aproximadamente 10 MPa, aproximadamente 20 MPa, aproximadamente 30 MPa, aproximadamente 40 MPa, aproximadamente 50 MPa, aproximadamente 60 MPa, aproximadamente 70 MPa, aproximadamente 80 MPa, aproximadamente 90 MPa, aproximadamente 100 MPa, aproximadamente 200 MPa, aproximadamente 300 MPa, aproximadamente 400 MPa, aproximadamente 500 MPa. En otros aspectos de esta realización, un hidrogel de fibroína de seda presenta una tensión de fluencia, por ejemplo, de al menos 0,1 MPa, al menos 0,5 MPa, al menos 1 MPa, al menos 5 MPa, al menos 10 MPa, al menos 20 MPa, al menos 30 MPa, al menos 40 MPa, al menos 50 MPa, al menos 60 MPa, al menos 70 MPa, al menos 80 MPa, al menos 90 MPa, al menos 100 MPa, al menos 200 MPa, al menos 300 MPa, al menos 400 MPa, al menos 500 MPa. En otros aspectos más de esta realización, un hidrogel de fibroína de seda presenta una tensión de fluencia, por ejemplo, de como máximo 1 MPa, como máximo 5 MPa, como máximo 10 MPa, como máximo 20 MPa, como máximo 30 MPa, como máximo 40 MPa, como máximo 50 MPa, como máximo 60 MPa, como máximo 70 MPa, como máximo 80 MPa, como máximo 90 MPa, como máximo 100 MPa, como máximo 200 MPa, como máximo 300 MPa, como máximo 400 MPa, como máximo 500 MPa, como máximo 600 MPa, como máximo 700 MPa, como máximo 800 MPa, como máximo 900 MPa, como máximo 1.000 MPa, como máximo 1.500 MPa o como máximo 2.000 MPa. En otros aspectos adicionales de esta realización, un hidrogel de fibroína de seda presenta una tensión de fluencia, por ejemplo, de aproximadamente 1 MPa a aproximadamente 50 MPa, aproximadamente 1 MPa a aproximadamente 60 MPa, aproximadamente 1 MPa a aproximadamente 70 MPa, aproximadamente 1 MPa a aproximadamente 80 MPa, aproximadamente 1 MPa a aproximadamente 90 MPa, aproximadamente 1 MPa a aproximadamente 100 MPa, aproximadamente 10 MPa a aproximadamente 50 MPa, aproximadamente 10 MPa a aproximadamente 60 MPa, aproximadamente 10 MPa a aproximadamente 70 MPa, aproximadamente 10 MPa a aproximadamente 80 MPa, aproximadamente 10 MPa a aproximadamente 90 MPa, aproximadamente 10 MPa a aproximadamente 100 MPa, aproximadamente 10 MPa a aproximadamente 200 MPa, aproximadamente 10 MPa a aproximadamente 300 MPa o aproximadamente 100 MPa a aproximadamente 300 MPa.

En otra realización, un hidrogel de fibroína de seda presenta una resistencia máxima alta. En aspectos de esta realización, un hidrogel de fibroína de seda presenta una resistencia máxima, por ejemplo, de aproximadamente 0,1 MPa, aproximadamente 0,5 MPa, aproximadamente 1 MPa, aproximadamente 5 MPa, aproximadamente 10 MPa, aproximadamente 20 MPa, aproximadamente 30 MPa, aproximadamente 40 MPa, aproximadamente 50 MPa, aproximadamente 60 MPa, aproximadamente 70 MPa, aproximadamente 80 MPa, aproximadamente 90 MPa, aproximadamente 100 MPa, aproximadamente 200 MPa, aproximadamente 300 MPa, aproximadamente 400 MPa, aproximadamente 500 MPa. En otros aspectos de esta realización, un hidrogel de fibroína de seda presenta una resistencia máxima, por ejemplo, de al menos 0,1 MPa, al menos 0,5 MPa, al menos 1 MPa, al menos 5 MPa, al menos 10 MPa, al menos 20 MPa, al menos 30 MPa, al menos 40 MPa, al menos 50 MPa, al menos 60 MPa, al menos 70 MPa, al menos 80 MPa, al menos 90 MPa, al menos 100 MPa, al menos 200 MPa, al menos 300 MPa, al menos 400 MPa, al menos 500 MPa. En otros aspectos más de esta realización, un hidrogel de fibroína de seda presenta una resistencia máxima, por ejemplo, de como máximo 1 MPa, como máximo 5 MPa, como máximo 10 MPa, como máximo 20 MPa, como máximo 30 MPa, como máximo 40 MPa, como máximo 50 MPa, como máximo 60 MPa, como máximo 70 MPa, como máximo 80 MPa, como máximo 90 MPa, como máximo 100 MPa, como máximo 200 MPa, como máximo 300 MPa, como máximo 400 MPa, como máximo 500 MPa, como máximo 600 MPa, como máximo 700 MPa, como máximo 800 MPa, como máximo 900 MPa, como máximo 1.000 MPa, como máximo 1.500 MPa o como máximo 2.000 MPa. En otros aspectos adicionales de esta realización, un hidrogel de fibroína de seda presenta una resistencia máxima, por ejemplo, de aproximadamente 1 MPa a aproximadamente 50 MPa, aproximadamente 1 MPa a aproximadamente 60 MPa, aproximadamente 1 MPa a aproximadamente 70 MPa, aproximadamente 1 MPa a aproximadamente 80 MPa, aproximadamente 1 MPa a aproximadamente 90 MPa, aproximadamente 1 MPa a aproximadamente 100 MPa, aproximadamente 10 MPa a aproximadamente 50 MPa, aproximadamente 10 MPa a aproximadamente 60 MPa, aproximadamente 10 MPa a aproximadamente 70 MPa, aproximadamente 10 MPa a aproximadamente 80 MPa, aproximadamente 10 MPa a aproximadamente 90 MPa, aproximadamente 10 MPa a aproximadamente 100 MPa, aproximadamente 10 MPa a aproximadamente 200 MPa, aproximadamente 10 MPa a aproximadamente 300 MPa o aproximadamente 100 MPa a aproximadamente 300 MPa.

En otra realización, un hidrogel de fibroína de seda presenta una resistencia a la rotura alta. En aspectos de esta realización, un hidrogel de fibroína de seda presenta una resistencia a la rotura, por ejemplo, de aproximadamente 0,1 MPa, aproximadamente 0,5 MPa, aproximadamente 1 MPa, aproximadamente 5 MPa, aproximadamente 10 MPa, aproximadamente 20 MPa, aproximadamente 30 MPa, aproximadamente 40 MPa, aproximadamente 50 MPa, aproximadamente 60 MPa, aproximadamente 70 MPa, aproximadamente 80 MPa, aproximadamente 90 MPa, aproximadamente 100 MPa, aproximadamente 200 MPa, aproximadamente 300 MPa, aproximadamente 400 MPa, aproximadamente 500 MPa. En otros aspectos de esta realización, un hidrogel de fibroína de seda presenta una resistencia a la rotura, por ejemplo, de al menos 0,1 MPa, al menos 0,5 MPa, al menos 1 MPa, al menos 5 MPa, al menos 10 MPa, al menos 20 MPa, al menos 30 MPa, al menos 40 MPa, al menos 50 MPa, al menos 60 MPa, al menos 70 MPa, al menos 80 MPa, al menos 90 MPa, al menos 100 MPa, al menos 200 MPa, al menos 300 MPa, al menos 400 MPa, al menos 500 MPa. En otros aspectos más de esta realización, un hidrogel de fibroína de seda presenta una resistencia a la rotura, por ejemplo, de como máximo 1 MPa, como máximo 5 MPa, como máximo 10 MPa, como máximo 20 MPa, como máximo 30 MPa, como máximo 40 MPa, como máximo 50 MPa, como máximo 60 MPa, como máximo 70 MPa, como máximo 80 MPa, como máximo 90 MPa, como máximo 100 MPa, como máximo 200 MPa, como máximo 300 MPa, como máximo 400 MPa, como máximo 500 MPa, como máximo 600 MPa, como máximo 700 MPa, como máximo 800 MPa, como máximo 900 MPa, como máximo 1.000 MPa, como máximo 1.500 MPa o como máximo 2.000 MPa. En otros aspectos adicionales de esta realización, un hidrogel de fibroína de seda presenta una resistencia a la rotura, por ejemplo, de aproximadamente 1 MPa a aproximadamente 50 MPa, aproximadamente 1 MPa a aproximadamente 60 MPa, aproximadamente 1 MPa a aproximadamente 70 MPa, aproximadamente 1 MPa a aproximadamente 80 MPa, aproximadamente 1 MPa a aproximadamente 90 MPa, aproximadamente 1 MPa a aproximadamente 100 MPa, aproximadamente 10 MPa a aproximadamente 50 MPa, aproximadamente 10 MPa a aproximadamente 60 MPa, aproximadamente 10 MPa a aproximadamente 70 MPa, aproximadamente 10 MPa a aproximadamente 80 MPa, aproximadamente 10 MPa a aproximadamente 90 MPa, aproximadamente 10 MPa a aproximadamente 100 MPa, aproximadamente 10 MPa a aproximadamente 200 MPa, aproximadamente 10 MPa a aproximadamente 300 MPa o aproximadamente 100 MPa a aproximadamente 300 MPa.

Los aspectos de la presente especificación proporcionan, en parte, un hidrogel de fibroína de seda que tiene una transparencia y/o translucidez. Transparencia (también denominada claridad o diafanidad) es la propiedad física de permitir que la luz pase a través de un material, mientras que translucidez (también denominada translucencia o translucididad) sólo permite pasar la luz a través de manera difusa. La propiedad opuesta es opacidad. Los materiales transparentes son claros, mientras que a través de los translúcidos no se puede ver claramente. Los hidrogeles de fibroína de seda descritos en la presente especificación pueden, o no, presentar propiedades ópticas tales como transparencia y translucidez. En determinados casos, por ejemplo, relleno de arrugas superficiales, sería una ventaja tener un hidrogel opaco. En otros casos tal como desarrollo de una lente o un "humor" para relleno en el ojo, sería una ventaja tener un hidrogel translúcido. Estas propiedades podrían modificarse influyendo en la distribución estructural del

material de hidrogel. Los factores usados para controlar las propiedades ópticas de un hidrogel incluyen, sin limitación, concentración de fibroína de seda, cristalinidad del gel y homogeneidad del hidrogel.

5 Cuando la luz se encuentra con un material, puede interactuar con él de varias formas diferentes. Estas interacciones dependen de la naturaleza de la luz (su longitud de onda, frecuencia, energía, etc.) y de la naturaleza del material. Las ondas de la luz interactúan con un objeto por combinación de reflexión, y transmitancia con refracción. Como tal, un material ópticamente transparente permite que gran parte de la luz que llega a él se transmita, reflejándose poca luz. Los materiales que no permiten la transmisión de la luz se denominan ópticamente opacos o simplemente opacos.

10 En una realización, un hidrogel de fibroína de seda es ópticamente transparente. En aspectos de esta realización, un hidrogel de fibroína de seda transmite, por ejemplo, aproximadamente 75% de la luz, aproximadamente 80% de la luz, aproximadamente 85% de la luz, aproximadamente 90% de la luz, aproximadamente 95% de la luz o aproximadamente 100% de la luz. En otros aspectos de esta realización, un hidrogel de fibroína de seda transmite, por ejemplo, al menos 75% de la luz, al menos 80% de la luz, al menos 85% de la luz, al menos 90% de la luz o al menos 95% de la luz. En otros aspectos más de esta realización, un hidrogel de fibroína de seda transmite, por ejemplo, aproximadamente 75% a aproximadamente 100% de la luz, aproximadamente 80% a aproximadamente 100% de la luz, aproximadamente 85% a aproximadamente 100% de la luz, aproximadamente 90% a aproximadamente 100% de la luz o aproximadamente 95% a aproximadamente 100% de la luz.

20 En otra realización, un hidrogel de fibroína de seda es ópticamente opaco. En aspectos de esta realización, un hidrogel de fibroína de seda transmite, por ejemplo, aproximadamente 5% de la luz, aproximadamente 10% de la luz, aproximadamente 15% de la luz, aproximadamente 20% de la luz, aproximadamente 25% de la luz, aproximadamente 30% de la luz, aproximadamente 35% de la luz, aproximadamente 40% de la luz, aproximadamente 45% de la luz, aproximadamente 50% de la luz, aproximadamente 55% de la luz, aproximadamente 60% de la luz, aproximadamente 65% de la luz o aproximadamente 70% de la luz. En otros aspectos de esta realización, un hidrogel de fibroína de seda transmite, por ejemplo, como máximo 5% de la luz, como máximo 10% de la luz, como máximo 15% de la luz, como máximo 20% de la luz, como máximo 25% de la luz, como máximo 30% de la luz, como máximo 35% de la luz, como máximo 40% de la luz, como máximo 45% de la luz, como máximo 50% de la luz, como máximo 55% de la luz, como máximo 60% de la luz, como máximo 65% de la luz, como máximo 70% de la luz o como máximo 75% de la luz. En otros aspectos de esta realización, un hidrogel de fibroína de seda transmite, por ejemplo, aproximadamente 5% a aproximadamente 15%, aproximadamente 5% a aproximadamente 20%, aproximadamente 5% a aproximadamente 25%, aproximadamente 5% a aproximadamente 30%, aproximadamente 5% a aproximadamente 35%, aproximadamente 5% a aproximadamente 40%, aproximadamente 5% a aproximadamente 45%, aproximadamente 5% a aproximadamente 50%, aproximadamente 5% a aproximadamente 55%, aproximadamente 5% a aproximadamente 60%, aproximadamente 5% a aproximadamente 65%, aproximadamente 5% a aproximadamente 70%, aproximadamente 5% a aproximadamente 75%, aproximadamente 15% a aproximadamente 20%, aproximadamente 15% a aproximadamente 25%, aproximadamente 15% a aproximadamente 30%, aproximadamente 15% a aproximadamente 35%, aproximadamente 15% a aproximadamente 40%, aproximadamente 15% a aproximadamente 45%, aproximadamente 15% a aproximadamente 50%, aproximadamente 15% a aproximadamente 55%, aproximadamente 15% a aproximadamente 60%, aproximadamente 15% a aproximadamente 65%, aproximadamente 15% a aproximadamente 70%, aproximadamente 15% a aproximadamente 75%, aproximadamente 25% a aproximadamente 35%, aproximadamente 25% a aproximadamente 40%, aproximadamente 25% a aproximadamente 45%, aproximadamente 25% a aproximadamente 50%, aproximadamente 25% a aproximadamente 55%, aproximadamente 25% a aproximadamente 60%, aproximadamente 25% a aproximadamente 65%, aproximadamente 25% a aproximadamente 70% o aproximadamente 25% a aproximadamente 75%.

45 En una realización, un hidrogel de fibroína de seda es ópticamente translúcido. En aspectos de esta realización, un hidrogel de fibroína de seda transmite de manera difusa, por ejemplo, aproximadamente 75% de la luz, aproximadamente 80% de la luz, aproximadamente 85% de la luz, aproximadamente 90% de la luz, aproximadamente 95% de la luz o aproximadamente 100% de la luz. En otros aspectos de esta realización, un hidrogel de fibroína de seda transmite de manera difusa, por ejemplo, al menos 75% de la luz, al menos 80% de la luz, al menos 85% de la luz, al menos 90% de la luz o al menos 95% de la luz. En otros aspectos más de esta realización, un hidrogel de fibroína de seda transmite de manera difusa, por ejemplo, aproximadamente 75% a aproximadamente 100% de la luz, aproximadamente 80% a aproximadamente 100% de la luz, aproximadamente 85% a aproximadamente 100% de la luz, aproximadamente 90% a aproximadamente 100% de la luz o aproximadamente 95% a aproximadamente 100% de la luz.

55 Para eliminar las especies potenciadoras del gel formado y convertirse en un hidrogel más completo, el gel formado puede extraerse frente a agua, por ejemplo en condiciones de temperatura y presión ambiente durante tres días con cinco cambios de agua. El gel puede extraerse frente a agua ultra-pura con un volumen de al menos 100 veces el del gel. Más específicamente, por ejemplo, los geles pueden ponerse en un volumen de agua purificada y el lavado cambiarse en las horas 12, 24 y 48 con 15 mL de gel por 1,5 L de agua. El número de lavados y proporciones de

volumen implicados pueden alterarse siempre que el hidrogel resultante carezca sustancialmente de potenciador de la gelificación residual.

El hidrogel puede procesarse adicionalmente para limpieza, carga y esterilización para uso. Por ejemplo, el hidrogel puede pulverizarse y mezclarse con disolución salina. En un ejemplo particular, el gel puede molerse hasta un tamaño de partícula de aproximadamente 10 μm a aproximadamente 1.000 μm de diámetro, tal como 15 μm a 30 μm . El salino se añade al hidrogel como una fase vehicular determinando en primer lugar el volumen de un hidrogel bruto, después pulverizando vigorosamente el hidrogel mientras se incorpora un volumen apropiado de salino al hidrogel para conseguir una proporción vehículo a hidrogel deseada. Por ejemplo, el molido del hidrogel puede conseguirse en un ejemplo mediante un tamizado forzado de material de hidrogel bruto a través de una serie de tamices de tela de acero inoxidable con tamaños de poro decrecientes. En otro ejemplo, el hidrogel puede cargarse en una jeringa y pulverizarse con una espátula hasta una pasta fina con salino. Las presentes formulaciones de hidrogel son preferiblemente estériles.

En un aspecto de esta realización, una formulación de hidrogel comprende una fase de gel que incluye partículas de hidrogel que tienen un tamaño de partícula de aproximadamente 5 μm^2 a aproximadamente 1.000 μm^2 de área transversal. En aspectos de esta realización, una formulación de hidrogel comprende una fase de gel que incluye partículas de hidrogel que tienen un tamaño de partícula medio, por ejemplo, de aproximadamente 5 μm^2 , aproximadamente 10 μm^2 , aproximadamente 15 μm^2 , aproximadamente 20 μm^2 , aproximadamente 25 μm^2 , aproximadamente 30 μm^2 , aproximadamente 35 μm^2 , aproximadamente 40 μm^2 , aproximadamente 45 μm^2 , aproximadamente 50 μm^2 , aproximadamente 60 μm^2 , aproximadamente 70 μm^2 , aproximadamente 80 μm^2 , aproximadamente 90 μm^2 , aproximadamente 100 μm^2 , aproximadamente 200 μm^2 , aproximadamente 300 μm^2 , aproximadamente 400 μm^2 , aproximadamente 500 μm^2 , aproximadamente 600 μm^2 , aproximadamente 700 μm^2 , aproximadamente 800 μm^2 , aproximadamente 900 μm^2 o aproximadamente 1.000 μm^2 de área transversal. En otros aspectos de la realización, una formulación de hidrogel comprende una fase de gel que incluye partículas de hidrogel que tienen un tamaño de partícula medio, por ejemplo, de al menos 5 μm^2 , al menos 10 μm^2 , al menos 15 μm^2 , al menos 20 μm^2 , al menos 25 μm^2 , al menos 30 μm^2 , al menos 35 μm^2 , al menos 40 μm^2 , al menos 45 μm^2 , al menos 50 μm^2 , al menos 60 μm^2 , al menos 70 μm^2 , al menos 80 μm^2 , al menos 90 μm^2 , al menos 100 μm^2 , al menos 200 μm^2 , al menos 300 μm^2 , al menos 400 μm^2 , al menos 500 μm^2 , al menos 600 μm^2 , al menos 700 μm^2 , al menos 800 μm^2 , al menos 900 μm^2 o al menos 1.000 μm^2 de área transversal. En otros aspectos más de esta realización, una formulación de hidrogel comprende una fase de gel que incluye partículas de hidrogel que tienen un tamaño de partícula medio, por ejemplo, de como máximo 5 μm^2 , como máximo 10 μm^2 , como máximo 15 μm^2 , como máximo 20 μm^2 , como máximo 25 μm^2 , como máximo 30 μm^2 , como máximo 35 μm^2 , como máximo 40 μm^2 , como máximo 45 μm^2 , como máximo 50 μm^2 , como máximo 60 μm^2 , como máximo 70 μm^2 , como máximo 80 μm^2 , como máximo 90 μm^2 , como máximo 100 μm^2 , como máximo 200 μm^2 , como máximo 300 μm^2 , como máximo 400 μm^2 , como máximo 500 μm^2 , como máximo 600 μm^2 , como máximo 700 μm^2 , como máximo 800 μm^2 , como máximo 900 μm^2 o como máximo 1.000 μm^2 de área transversal. En otros aspectos adicionales de la realización, una formulación de hidrogel comprende una fase de gel que incluye partículas de hidrogel que tienen un tamaño de partícula medio, por ejemplo, de aproximadamente 5 μm^2 a aproximadamente 50 μm^2 , aproximadamente 25 μm^2 a aproximadamente 75 μm^2 , aproximadamente 50 μm^2 a aproximadamente 100 μm^2 , aproximadamente 100 μm^2 a aproximadamente 300 μm^2 , aproximadamente 200 μm^2 a aproximadamente 400 μm^2 , aproximadamente 300 μm^2 a aproximadamente 500 μm^2 , aproximadamente 400 μm^2 a aproximadamente 600 μm^2 , aproximadamente 500 μm^2 a aproximadamente 700 μm^2 , aproximadamente 600 μm^2 a aproximadamente 800 μm^2 , aproximadamente 700 μm^2 a aproximadamente 900 μm^2 , aproximadamente 800 μm^2 a aproximadamente 1.000 μm^2 , aproximadamente 100 μm^2 a aproximadamente 400 μm^2 , aproximadamente 300 μm^2 a aproximadamente 600 μm^2 , aproximadamente 500 μm^2 a aproximadamente 800 μm^2 o aproximadamente 700 μm^2 a aproximadamente 1.000 μm^2 , de área transversal.

En aspectos de esta realización, una formulación de hidrogel comprende una fase de gel que incluye partículas de hidrogel que tienen un tamaño de partícula, por ejemplo, de al menos 5 μm^2 , al menos 10 μm^2 , al menos 15 μm^2 , al menos 20 μm^2 , al menos 25 μm^2 , al menos 30 μm^2 , al menos 35 μm^2 , al menos 40 μm^2 , al menos 45 μm^2 , al menos 50 μm^2 , al menos 60 μm^2 , al menos 70 μm^2 , al menos 80 μm^2 , al menos 90 μm^2 , al menos 100 μm^2 , al menos 200 μm^2 , al menos 300 μm^2 , al menos 400 μm^2 , al menos 500 μm^2 , al menos 600 μm^2 , al menos 700 μm^2 , al menos 800 μm^2 , al menos 900 μm^2 o al menos 1.000 μm^2 de área transversal. En otros aspectos de esta realización, una formulación de hidrogel comprende una fase de gel que incluye partículas de hidrogel que tienen un tamaño de partícula, por ejemplo, de como máximo 5 μm^2 , como máximo 10 μm^2 , como máximo 15 μm^2 , como máximo 20 μm^2 , como máximo 25 μm^2 , como máximo 30 μm^2 , como máximo 35 μm^2 , como máximo 40 μm^2 , como máximo 45 μm^2 , como máximo 50 μm^2 , como máximo 60 μm^2 , como máximo 70 μm^2 , como máximo 80 μm^2 , como máximo 90 μm^2 , como máximo 100 μm^2 , como máximo 200 μm^2 , como máximo 300 μm^2 , como máximo 400 μm^2 , como máximo 500 μm^2 , como máximo 600 μm^2 , como máximo 700 μm^2 , como máximo 800 μm^2 , como máximo 900 μm^2 o como máximo 1.000 μm^2 de área transversal. En otros aspectos más de la realización, una formulación de hidrogel comprende una fase de gel que incluye partículas de

- 5 hidrogel que tienen un tamaño de partícula, por ejemplo, de aproximadamente $5 \mu\text{m}^2$ a aproximadamente $50 \mu\text{m}^2$, aproximadamente $25 \mu\text{m}^2$ a aproximadamente $75 \mu\text{m}^2$, aproximadamente $50 \mu\text{m}^2$ a aproximadamente $100 \mu\text{m}^2$, aproximadamente $100 \mu\text{m}^2$ a aproximadamente $300 \mu\text{m}^2$, aproximadamente $200 \mu\text{m}^2$ a aproximadamente $400 \mu\text{m}^2$, aproximadamente $300 \mu\text{m}^2$ a aproximadamente $500 \mu\text{m}^2$, aproximadamente $400 \mu\text{m}^2$ a aproximadamente $600 \mu\text{m}^2$, aproximadamente $500 \mu\text{m}^2$ a aproximadamente $700 \mu\text{m}^2$, aproximadamente $600 \mu\text{m}^2$ a aproximadamente $800 \mu\text{m}^2$, aproximadamente $700 \mu\text{m}^2$ a aproximadamente $900 \mu\text{m}^2$, aproximadamente $800 \mu\text{m}^2$ a aproximadamente $1.000 \mu\text{m}^2$, aproximadamente $100 \mu\text{m}^2$ a aproximadamente $400 \mu\text{m}^2$, aproximadamente $300 \mu\text{m}^2$ a aproximadamente $600 \mu\text{m}^2$, aproximadamente $500 \mu\text{m}^2$ a aproximadamente $800 \mu\text{m}^2$ o aproximadamente $700 \mu\text{m}^2$ a aproximadamente $1.000 \mu\text{m}^2$, de área transversal.
- 10 Los aspectos de las presentes formulaciones de hidrogel proporcionan, en parte, una fase vehicular. Una fase vehicular es ventajosamente una fase vehicular fisiológicamente aceptable y puede incluir uno o más excipientes convencionales útiles en composiciones farmacéuticas. Tal y como se usa en la presente memoria, el término "una fase vehicular fisiológicamente aceptable" se refiere a una fase vehicular de acuerdo con, o característica de, el funcionamiento normal de un organismo vivo. Como tal, la administración de una formulación de hidrogel descrita en la presente composición
- 15 comprende una fase vehicular que sustancialmente no tiene un efecto perjudicial a largo plazo o permanente cuando se administra a un mamífero. Las presentes composiciones incluyen preferiblemente una fase vehicular en la que una parte principal del volumen es agua o salino. Sin embargo, otras fases vehiculares útiles incluyen cualquier tampón, suero u otras disoluciones de proteína fisiológicamente tolerables.
- 20 El volumen de la fase vehicular por volumen de fase de gel puede incrementarse o disminuirse en un intervalo entre 0% a 100% dependiendo de las propiedades físicas deseadas de la formulación resultante incluyendo administración de dosis, viscosidad, inyectabilidad y características de comportamiento deseadas *in vivo*. Esta formulación se mezcla hasta que se consigue una formulación de hidrogel con una consistencia "uniforme" que puede denominarse una emulsión o suspensión. Más específicamente, por ejemplo, un hidrogel puede pasarse a través de una aguja 18g varias veces para disminuir el tamaño de las partículas, inyectarse hacia atrás y adelante entre un par de jeringas y repetirse este
- 25 procedimiento con agujas 22g fijadas a jeringas de 1 mL. Las ventajas derivadas de añadir una fase vehicular a la fase de gel incluyen viscosidad disminuida en el microentorno extracelular *in vivo*; liberación de la carga local de esfuerzo mecánico después de la administración de la formulación de hidrogel; y composición iónica mejorada que resulta en una biocompatibilidad mejorada.
- 30 El hidrogel de seda descrito en la presente especificación puede formularse usando restricciones en el procesamiento del material tales como concentración de la seda y concentración de salino para personalizar la longevidad del material *in vivo*. En un ejemplo, un gel de seda podría personalizarse para una persistencia de cinco semanas a seis semanas *in vivo* usando un gel de seda al 1%-3% (p/v) con vehículo salino al 25%-50% (v/v). En otro ejemplo, un gel de seda podría personalizarse para una persistencia de dos meses a tres meses *in vivo* usando un gel de seda al 3%-5% (p/v) con salino al 20%-40% (v/v). En otro ejemplo, un gel de seda podría personalizarse para una persistencia de 5-6 meses
- 35 usando un gel de seda al 4%-6% (p/v) con salino al 20%-40% (v/v). En otro ejemplo, un gel de seda podría personalizarse para una persistencia de 7-10 meses usando un gel de seda al 6%-8% (p/v) con salino al 20%-30% (v/v). La persistencia de estos materiales también podría incrementarse o disminuirse incrementando o disminuyendo el tamaño de las partículas, respectivamente.
- 40 El contenido de salino en la emulsión del gel y la concentración de seda en el gel podrían usarse para modificar el perfil mecánico de los materiales de gel de seda para aplicaciones particulares. Por ejemplo, una emulsión de gel con una concentración de seda en el gel de aproximadamente 1% (p/v) a aproximadamente 5% (p/v) con lubricante al 5%-95% (por ejemplo, salino/PBS 5%-95% (p/v)) puede ser útil como relleno dérmico, agente de volumen, agente de camuflaje, relleno intramuscular o sub-Q o vector de administración farmacéutica. Una emulsión de gel, por ejemplo, con una concentración de seda en el gel de aproximadamente 5% (p/v) a aproximadamente 8% (p/v) con 0% a aproximadamente
- 45 30% de fluido lubricante puede ser útil en defectos óseos o defectos de cartílago.
- Los aspectos de la presente especificación proporcionan, en parte, una formulación de hidrogel descrita en la presente especificación que presenta una viscosidad dinámica. La viscosidad es la resistencia de un fluido a cizalla o flujo causado por esfuerzo de cizalla o esfuerzo de tracción. La viscosidad describe la resistencia interna de un fluido para fluir causada por la fricción intermolecular ejercida cuando las capas de los fluidos intentan deslizarse entre sí y puede
- 50 pensarse como una medida de la fricción de los fluidos. Cuanto menos viscoso es el fluido, mayor es la facilidad de movimiento (fluidez).
- La viscosidad puede definirse de dos maneras: viscosidad dinámica (μ , aunque a veces se usa η) o viscosidad cinemática (ν). La viscosidad dinámica, también conocida como viscosidad absoluta o compleja, es la fuerza tangencial por unidad de área requerida para mover un plano horizontal respecto al otro a velocidad unitaria cuando se mantiene una distancia unitaria entre ellos por el fluido. La unidad física del SI de la viscosidad dinámica es el Pascal-segundo
- 55 (Pa·s), que es idéntico a N·m⁻²·s. La viscosidad dinámica puede expresarse como $T = \mu \, dv_x/dz$, donde T = esfuerzo de

5 cizalla, μ = viscosidad dinámica y dv_x/dz es el gradiente de velocidad en el tiempo. Por ejemplo, si un fluido con una viscosidad de un Pa·s se pone entre dos placas, y una placa se empuja lateralmente con un esfuerzo de cizalla de un Pascal, se mueve una distancia igual al espesor de la capa entre las placas en un segundo. La viscosidad dinámica representada por η se usa, se mide con varios tipos de reómetros, dispositivos usados para medir la manera en la que un líquido, suspensión o suspensión de sólidos fluye en respuesta a fuerzas aplicadas.

La viscosidad cinemática (ν) es la proporción de viscosidad dinámica a densidad, una cantidad en la que no está implicada ninguna fuerza y se define como sigue: $\nu = \mu/\rho$, donde μ es la viscosidad dinámica ρ es densidad con la unidad del SI de kg/m^3 . La viscosidad cinemática se mide habitualmente por un viscosímetro capilar de vidrio y tiene una unidad del SI de m^2/s .

10 La viscosidad de un fluido es muy dependiente de la temperatura y para que la viscosidad dinámica o cinemática tengan sentido, debe indicarse la temperatura de referencia. Para los valores de viscosidad descritos en la presente especificación, se mide una viscosidad dinámica a 1 Pa con una geometría cono/plano $2^\circ/40$ cm y una temperatura de 20°C . Los ejemplos de viscosidad dinámica de varios fluidos a 20°C es como sigue: el agua tiene aproximadamente $1,0 \times 10^{-3}$ Pa·s, la sangre tiene aproximadamente $3-4 \times 10^{-3}$ Pa·s, el aceite vegetal tiene aproximadamente $60-85 \times 10^{-3}$ Pa·s, el aceite de motor SE 30 tiene aproximadamente 0,2 Pa·s, la glicerina tiene aproximadamente 1,4 Pa·s, el jarabe de arce tiene aproximadamente 2-3 Pa·s, la miel tiene aproximadamente 10 Pa·s, el jarabe de chocolate tiene aproximadamente 10-25 Pa·s, la manteca de cacahuate tiene aproximadamente 150-250 Pa·s, la manteca de cerdo tiene aproximadamente 1.000 Pa·s, la manteca vegetal tiene aproximadamente 1.200 Pa·s y el alquitrán tiene aproximadamente 30.000 Pa·s.

20 Así, en una realización, una formulación de hidrogel que comprende una fase de gel, incluyendo la fase de gel partículas de hidrogel que comprenden una fibroína de seda sustancialmente desprovista de sericina y una fase vehicular presenta una viscosidad dinámica. En aspectos de esta realización, una composición de hidrogel que comprende una fase de gel, incluyendo la fase de gel partículas de hidrogel que comprenden una fibroína de seda sustancialmente desprovista de sericina y una fase vehicular presenta una viscosidad dinámica, por ejemplo, de aproximadamente 10 Pa·s, aproximadamente 20 Pa·s, aproximadamente 30 Pa·s, aproximadamente 40 Pa·s, aproximadamente 50 Pa·s, aproximadamente 60 Pa·s, aproximadamente 70 Pa·s, aproximadamente 80 Pa·s, aproximadamente 90 Pa·s, aproximadamente 100 Pa·s, aproximadamente 125 Pa·s, aproximadamente 150 Pa·s, aproximadamente 175 Pa·s, aproximadamente 200 Pa·s, aproximadamente 225 Pa·s, aproximadamente 250 Pa·s, aproximadamente 275 Pa·s, aproximadamente 300 Pa·s, aproximadamente 400 Pa·s, aproximadamente 500 Pa·s, aproximadamente 600 Pa·s, aproximadamente 700 Pa·s, aproximadamente 750 Pa·s, aproximadamente 800 Pa·s, aproximadamente 900 Pa·s, aproximadamente 1.000 Pa·s, aproximadamente 1.100 Pa·s o aproximadamente 1.200 Pa·s. En otros aspectos de esta realización, una formulación de hidrogel que comprende una fase de gel, incluyendo la fase de gel partículas de hidrogel que comprenden una fibroína de seda sustancialmente desprovista de sericina y una fase vehicular presenta una viscosidad dinámica, por ejemplo, de como máximo 10 Pa·s, como máximo 20 Pa·s, como máximo 30 Pa·s, como máximo 40 Pa·s, como máximo 50 Pa·s, como máximo 60 Pa·s, como máximo 70 Pa·s, como máximo 80 Pa·s, como máximo 90 Pa·s, como máximo 100 Pa·s, como máximo 125 Pa·s, como máximo 150 Pa·s, como máximo 175 Pa·s, como máximo 200 Pa·s, como máximo 225 Pa·s, como máximo 250 Pa·s, como máximo 275 Pa·s, como máximo 300 Pa·s, como máximo 400 Pa·s, como máximo 500 Pa·s, como máximo 600 Pa·s, como máximo 700 Pa·s, como máximo 750 Pa·s, como máximo 800 Pa·s, como máximo 900 Pa·s o como máximo 1.000 Pa·s. En otros aspectos adicionales de esta realización, una formulación de hidrogel que comprende una fase de gel, incluyendo la fase de gel partículas de hidrogel que comprenden una fibroína de seda sustancialmente desprovista de sericina y una fase vehicular presenta una viscosidad dinámica, por ejemplo, de aproximadamente 10 Pa·s a aproximadamente 100 Pa·s, aproximadamente 10 Pa·s a aproximadamente 150 Pa·s, aproximadamente 10 Pa·s a aproximadamente 250 Pa·s, aproximadamente 50 Pa·s a aproximadamente 100 Pa·s, aproximadamente 50 Pa·s a aproximadamente 150 Pa·s, aproximadamente 50 Pa·s a aproximadamente 250 Pa·s, aproximadamente 100 Pa·s a aproximadamente 500 Pa·s, aproximadamente 100 Pa·s a aproximadamente 750 Pa·s, aproximadamente 100 Pa·s a aproximadamente 1.000 Pa·s, aproximadamente 100 Pa·s a aproximadamente 1.200 Pa·s, aproximadamente 300 Pa·s a aproximadamente 500 Pa·s, aproximadamente 300 Pa·s a aproximadamente 750 Pa·s, aproximadamente 300 Pa·s a aproximadamente 1.000 Pa·s o aproximadamente 300 Pa·s a aproximadamente 1.200 Pa·s.

50 Los aspectos de la presente especificación proporcionan, en parte, una formulación de hidrogel descrita en la presente especificación que es inyectable. Tal y como se usa en la presente memoria, el término "inyectable" se refiere a una formulación de hidrogel descrita en la presente especificación que tiene las propiedades necesarias para administrar la composición en una región dérmica de un individuo usando un dispositivo de inyección con una aguja fina. Tal y como se usa en la presente memoria, el término "aguja fina" se refiere a una aguja que tiene un calibre 27 o menor. La inyectabilidad de una formulación de hidrogel descrita en la presente especificación puede conseguirse dimensionando las partículas de hidrogel como se ha discutido anteriormente.

Así, en una realización, una formulación de hidrogel comprende una fase de gel, incluyendo la fase de gel partículas de hidrogel que comprenden una fibroína de seda sustancialmente desprovista de sericina y una fase vehicular, en la que la formulación es inyectable. En aspectos de esta realización, una formulación de hidrogel que comprende una fase de gel, incluyendo la fase de gel partículas de hidrogel que comprenden una fibroína de seda sustancialmente desprovista de sericina y una fase vehicular es inyectable a través de una aguja fina. En otros aspectos de esta realización, una formulación de hidrogel que comprende una fase de gel, incluyendo la fase de gel partículas de hidrogel que comprenden una fibroína de seda sustancialmente desprovista de sericina y una fase vehicular es inyectable a través de una aguja, por ejemplo, con un calibre de aproximadamente 27, con un calibre de aproximadamente 30 o con un calibre de aproximadamente 32. En otros aspectos adicionales de esta realización, una formulación de hidrogel que comprende una fase de gel, incluyendo la fase de gel partículas de hidrogel que comprenden una fibroína de seda sustancialmente desprovista de sericina y una fase vehicular es inyectable a través de una aguja, por ejemplo, con un calibre de aproximadamente 27 a calibre de aproximadamente 32.

En aspectos de esta realización, una formulación de hidrogel que comprende una fase de gel, incluyendo la fase de gel partículas de hidrogel que comprenden una fibroína de seda sustancialmente desprovista de sericina y una fase vehicular puede inyectarse con una fuerza de extrusión de aproximadamente 60 N, aproximadamente 55 N, aproximadamente 50 N, aproximadamente 45 N, aproximadamente 40 N, aproximadamente 35 N o aproximadamente 30 N. En otros aspectos de esta realización, una formulación de hidrogel que comprende una fase de gel, incluyendo la fase de gel partículas de hidrogel que comprenden una fibroína de seda sustancialmente desprovista de sericina y una fase vehicular puede inyectarse con una fuerza de extrusión de aproximadamente 60 N o menos, aproximadamente 55 N o menos, aproximadamente 50 N o menos, aproximadamente 45 N o menos, aproximadamente 40 N o menos, aproximadamente 35 N o menos, aproximadamente 30 N o menos, aproximadamente 25 N o menos, aproximadamente 20 N o menos, aproximadamente 15 N o menos, aproximadamente 10 N o menos o aproximadamente 5 N o menos.

Los aspectos de la presente especificación proporcionan, en parte, un hidrogel de fibroína de seda que presenta cohesividad. La cohesión o atracción cohesiva, fuerza cohesiva, o fuerza de compresión es una propiedad física de un material, causada por la atracción intermolecular entre moléculas semejantes en el material que actúa para unir las moléculas. Un hidrogel de fibroína de seda debe ser lo suficientemente cohesivo como para permanecer localizado en un sitio de administración. Además, en determinadas aplicaciones, una cohesividad suficiente es importante para que un hidrogel retenga su forma, y por lo tanto funcionalidad, en el caso de carga mecánica cíclica. Como tal, en una realización, un hidrogel de fibroína de seda presenta una atracción cohesiva fuerte, a la par con agua. En otra realización, un hidrogel de fibroína de seda presenta una atracción cohesiva baja. En otra realización adicional, un hidrogel de fibroína de seda presenta una atracción cohesiva suficiente para permanecer localizado en el sitio de administración. En otra realización más, un hidrogel de fibroína de seda presenta una atracción cohesiva suficiente para retener su forma. En una realización adicional, un hidrogel de fibroína de seda presenta una atracción cohesiva suficiente para retener su forma y funcionalidad.

En aspectos de esta realización, un hidrogel de fibroína de seda tiene una fuerza de compresión de aproximadamente 10 gramos-fuerza, aproximadamente 20 gramos-fuerza, aproximadamente 30 gramos-fuerza, aproximadamente 40 gramos-fuerza, aproximadamente 50 gramos-fuerza, aproximadamente 60 gramos-fuerza, aproximadamente 70 gramos-fuerza, aproximadamente 80 gramos-fuerza, aproximadamente 90 gramos-fuerza, aproximadamente 100 gramos-fuerza, aproximadamente 200 gramos-fuerza, aproximadamente 300 gramos-fuerza, aproximadamente 400 gramos-fuerza, aproximadamente 500 gramos-fuerza, aproximadamente 600 gramos-fuerza, aproximadamente 700 gramos-fuerza o aproximadamente 800 gramos-fuerza. En otros aspectos de esta realización, un hidrogel de fibroína de seda tiene una fuerza de compresión de al menos 500 gramos-fuerza, al menos 600 gramos-fuerza, al menos 700 gramos-fuerza, al menos 800 gramos-fuerza, al menos 900 gramos-fuerza, al menos 1.000 gramos-fuerza, al menos 1.250 gramos-fuerza, al menos 1.500 gramos-fuerza, al menos 1.750 gramos-fuerza, al menos 2.000 gramos-fuerza, al menos 2.250 gramos-fuerza, al menos 2.500 gramos-fuerza, al menos 2.750 gramos-fuerza o al menos 3.000 gramos-fuerza. En otros aspectos de esta realización, un hidrogel de fibroína de seda tiene una fuerza de compresión de como máximo 10 gramos-fuerza, como máximo 20 gramos-fuerza, como máximo 30 gramos-fuerza, como máximo 40 gramos-fuerza, como máximo 50 gramos-fuerza, como máximo 60 gramos-fuerza, como máximo 70 gramos-fuerza, como máximo 80 gramos-fuerza, como máximo 90 gramos-fuerza, como máximo 100 gramos-fuerza, como máximo 200 gramos-fuerza, como máximo 300 gramos-fuerza, como máximo 400 gramos-fuerza, como máximo 500 gramos-fuerza, como máximo 600 gramos-fuerza, como máximo 700 gramos-fuerza o como máximo 800 gramos-fuerza.

En otros aspectos adicionales de esta realización, un hidrogel de fibroína de seda tiene una fuerza de compresión de aproximadamente 10 gramos-fuerza a aproximadamente 50 gramos-fuerza, aproximadamente 25 gramos-fuerza a aproximadamente 75 gramos-fuerza, aproximadamente 50 gramos-fuerza a aproximadamente 150 gramos-fuerza, aproximadamente 100 gramos-fuerza a aproximadamente 200 gramos-fuerza, aproximadamente 100 gramos-fuerza a

aproximadamente 300 gramos-fuerza, aproximadamente 100 gramos-fuerza a aproximadamente 400 gramos-fuerza, aproximadamente 100 gramos-fuerza a aproximadamente 500 gramos-fuerza, aproximadamente 200 gramos-fuerza a aproximadamente 300 gramos-fuerza, aproximadamente 200 gramos-fuerza a aproximadamente 400 gramos-fuerza, aproximadamente 200 gramos-fuerza a aproximadamente 500 gramos-fuerza, aproximadamente 200 gramos-fuerza a aproximadamente 600 gramos-fuerza, aproximadamente 200 gramos-fuerza a aproximadamente 700 gramos-fuerza, aproximadamente 300 gramos-fuerza a aproximadamente 400 gramos-fuerza, aproximadamente 300 gramos-fuerza a aproximadamente 500 gramos-fuerza, aproximadamente 300 gramos-fuerza a aproximadamente 600 gramos-fuerza, aproximadamente 300 gramos-fuerza a aproximadamente 700 gramos-fuerza, aproximadamente 300 gramos-fuerza a aproximadamente 800 gramos-fuerza, aproximadamente 400 gramos-fuerza a aproximadamente 500, aproximadamente 400 gramos-fuerza a aproximadamente 600, aproximadamente 400 gramos-fuerza a aproximadamente 700, aproximadamente 400 gramos-fuerza a aproximadamente 800, aproximadamente 500 gramos-fuerza a aproximadamente 600 gramos-fuerza, aproximadamente 500 gramos-fuerza a aproximadamente 700 gramos-fuerza, aproximadamente 500 gramos-fuerza a aproximadamente 800 gramos-fuerza, aproximadamente 600 gramos-fuerza a aproximadamente 700 gramos-fuerza, aproximadamente 600 gramos-fuerza a aproximadamente 800 gramos-fuerza, aproximadamente 700 gramos-fuerza a aproximadamente 800 gramos-fuerza, aproximadamente 1.000 gramos-fuerza a aproximadamente 2.000 gramos-fuerza, aproximadamente 1.000 gramos-fuerza a aproximadamente 3.000 gramos-fuerza o aproximadamente 2.000 gramos-fuerza a aproximadamente 3.000 gramos-fuerza.

Los aspectos de las presentes formulaciones de hidrogel proporcionan, en parte, un tensioactivo. Tal y como se usa en la presente memoria, el término "tensioactivo" se refiere a un compuesto anfílico natural o sintético. Un tensioactivo puede ser no iónico, zwitteriónico o iónico. Se prevé que cualquier tensioactivo es útil para preparar una formulación de hidrogel descrita en la presente especificación, con la condición de que una cantidad terapéuticamente eficaz de la formulación de hidrogel se recupera usando esta cantidad de tensioactivo. Los ejemplos no limitativos de tensioactivos incluyen polisorbatos como polisorbato 20 (TWEEN® 20), polisorbato 40 (TWEEN® 40), polisorbato 60 (TWEEN® 60), polisorbato 61 (TWEEN® 61), polisorbato 65 (TWEEN® 65), polisorbato 80 (TWEEN® 80) y polisorbato 81 (TWEEN® 81); poloxámeros (copolímeros polietileno-polipropileno), como Poloxámero 124 (PLURONIC® L44), Poloxámero 181 (PLURONIC® L61), Poloxámero 182 (PLURONIC® L62), Poloxámero 184 (PLURONIC® L64), Poloxámero 188 (PLURONIC® F68), Poloxámero 237 (PLURONIC® F87), Poloxámero 338 (PLURONIC® L108), Poloxámero 407 (PLURONIC® F127), éteres polioxietilenglicol dodecilo, como BRIJ® 30 y BRIJ® 35; 2-dodecoxietanol (LUBROL® -PX); octil fenil éter de polioxietileno (TRITON® X-100); dodecil sulfato sódico (SDS); 3-[(3-Colamidopropil)dimetilamonio]-1-propanosulfonato (CHAPS); 3-[(3-Colamidopropil)dimetilamonio]-2-hidroxi-1-propanosulfonato (CHAPSO); monolaurato de sacarosa; y colato sódico. Otros ejemplos no limitativos de excipientes tensioactivos pueden encontrarse, por ejemplo, en *Pharmaceutical Dosage Forms and Drug Delivery Systems* (Howard C. Ansel et al., eds., Lippincott Williams & Wilkins Publishers, 7ª ed. 1999); *Remington: The Science and Practice of Pharmacy* (Alfonso R. Gennaro ed., Lippincott, Williams & Wilkins, 20ª ed. 2000); *Goodman & Gilman's The Pharmacological Basis of Therapeutics* (Joel G. Hardman et al., eds., McGraw-Hill Professional, 10ª ed. 2001); y *Handbook of Pharmaceutical Excipients* (Raymond C. Rowe et al., APhA Publications, 4ª edición 2003).

Así, en una realización, una formulación de hidrogel comprende un tensioactivo. En aspectos de esta realización, una formulación de hidrogel comprende un polisorbato, un poloxámero, un dodecil éter de polioxietilenglicol, 2-dodecoxietanol, octil fenil éter de polioxietileno, dodecil sulfato sódico, 3-[(3-Colamidopropil)dimetilamonio]-1-propanosulfonato, 3-[(3-Colamidopropil)dimetilamonio]-2-hidroxi-1-propanosulfonato, monolaurato de sacarosa; o colato sódico.

Las formulaciones de hidrogel descritas en la presente especificación pueden, o no, comprender un componente inductor de la viscosidad. Un componente inductor de la viscosidad está presente en una cantidad eficaz para incrementar la viscosidad de la formulación de hidrogel. Una viscosidad relativamente alta puede aumentar la capacidad de las presentes formulaciones de hidrogel de mantener a las partículas del hidrogel en una suspensión sustancialmente uniforme en las composiciones durante periodos prolongados de tiempo, por ejemplo, durante tanto como 1 a 2 años, sin requerir procesamiento de resuspensión. La viscosidad relativamente alta de las presentes composiciones también puede tener un beneficio adicional de al menos asistir a las composiciones para tener la capacidad de tener una cantidad o concentración incrementada de las partículas del hidrogel, mientras se mantienen dichas partículas del hidrogel en una suspensión sustancialmente uniforme durante periodos prolongados de tiempo.

Los componentes inductores de la viscosidad actualmente útiles son preferiblemente componentes de fluidificación por cizallamiento ya que cuando las presentes formulaciones de hidrogel que contienen dicho componente inductor de la viscosidad por fluidificación por cizallamiento se pasan o inyectan a través de un espacio estrecho, tal como una aguja de calibre 27, bajo condiciones de alto cizallamiento, la viscosidad de la composición se reduce sustancialmente durante dicho paso. Después de dicho paso, la composición recupera sustancialmente su viscosidad anterior a la inyección de manera que las partículas del componente corticosteroide se mantienen en suspensión en el ojo.

Cualquier componente inductor de la viscosidad adecuado, por ejemplo, puede emplearse según las formulaciones de hidrogel descritas en la presente especificación. El componente inductor de la viscosidad está presente en una cantidad eficaz para proporcionar la viscosidad deseada a la formulación de hidrogel. Ventajosamente, el componente inductor de la viscosidad está presente en una cantidad en un intervalo de aproximadamente 0,5% o aproximadamente 1,0% a aproximadamente 5% o aproximadamente 10% o aproximadamente 20% (p/v) de la formulación de hidrogel. La cantidad específica del componente inductor de la viscosidad empleada depende de varios factores incluyendo, sin limitación, el componente inductor de la viscosidad específico que se está empleando, el peso molecular del componente inductor de la viscosidad que se está empleando, la viscosidad deseada para la presente formulación de hidrogel que se está produciendo y/o usando y factores semejantes, tal como fluidificación por cizallamiento. El componente inductor de la viscosidad se elige para proporcionar al menos una ventaja, y preferiblemente múltiples ventajas, a la presente formulación de hidrogel, por ejemplo, en términos cada uno de inyectabilidad, viscosidad, sostenibilidad de las partículas del hidrogel en suspensión, por ejemplo, en suspensión sustancialmente uniforme, durante un periodo prolongado de tiempo sin procesamiento de resuspensión, compatibilidad con los tejidos en los que se va a poner la composición y ventajas semejantes. Más preferiblemente, el componente inductor de la viscosidad seleccionado es eficaz para proporcionar dos o más de los beneficios indicados anteriormente y aún más preferiblemente para proporcionar todos los beneficios indicados anteriormente.

El componente inductor de la viscosidad comprende preferiblemente un componente polimérico y/o al menos un agente viscoelástico. Los ejemplos de componentes inductores de la viscosidad útiles incluyen, pero no están limitados a, ácido hialurónico (tal como ácido hialurónico polimérico), carbómeros, ácido poliacrílico, derivados celulósicos, policarbofilo, polivinilpirrolidona, gelatina, dextrina, polisacáridos, poliacrilamida, polivinil alcohol, polivinil acetato, derivados de éstos y mezclas y copolímeros de éstos.

El peso molecular de los componentes inductores de la viscosidad actualmente útiles puede estar en un intervalo de aproximadamente 10.000 Da o menos a aproximadamente 2.000.000 Da o más. En una realización particularmente útil, el peso molecular del componente inductor de la viscosidad está en un intervalo de aproximadamente 100.000 Da o aproximadamente 200.000 Da a aproximadamente 1.000.000 Da o aproximadamente 1.500.000 Da. De nuevo, el peso molecular del componente inductor de la viscosidad útil según la presente especificación, puede variar en un intervalo sustancial tomando como base el tipo de componente inductor de la viscosidad empleado y la viscosidad final deseada de la presente composición en cuestión, así como, posiblemente uno o más factores adicionales.

En una realización, un componente inductor de la viscosidad es un componente hialuronato polimérico, por ejemplo, un componente hialuronato metálico, seleccionado preferiblemente de hialuronatos de metal alcalino, hialuronatos de metal alcalinotérreo y mezclas de éstos, y aún más preferiblemente seleccionado de hialuronatos de sodio, y mezclas de éstos. El peso molecular de dicho componente hialuronato (es decir, un ácido hialurónico polimérico) está preferiblemente en un intervalo de aproximadamente 50.000 Da o aproximadamente 100.000 Da a aproximadamente 1.300.000 Da o aproximadamente 2.000.000 Da. En una realización, las presentes composiciones incluyen un componente hialuronato polimérico en una cantidad en un intervalo aproximadamente 0,05% a aproximadamente 0,5% (p/v). En una realización útil adicional, el componente hialuronato está presente en una cantidad en un intervalo de aproximadamente 1% a aproximadamente 4% (p/v) de la composición. En este último caso, la muy alta viscosidad del polímero forma un gel que ralentiza la velocidad de sedimentación de las partículas hasta el grado de que habitualmente no es necesario ningún procesamiento de resuspensión durante la vida media a temperatura ambiente estimada, por ejemplo, al menos aproximadamente 2 años, de la composición. Dicha formulación puede comercializarse en jeringas pre-llenadas ya que el gel no puede sacarse fácilmente por una aguja y jeringa de un contenedor a granel. Las jeringas pre-llenadas tienen las ventajas de conveniencia para el inyector y la seguridad que resulta de una menor manipulación.

Los aspectos de la presente especificación proporcionan, en parte, una formulación de hidrogel descrita en la presente especificación, que es una formulación de hidrogel farmacéutica. Tal y como se usa en la presente memoria, el término "formulación de hidrogel farmacéutica" es sinónimo de "formulación de hidrogel farmacéuticamente aceptable" y se refiere a una concentración terapéuticamente eficaz de formulación de hidrogel, tal como, por ejemplo, cualquiera de las partículas de hidrogel o fármacos farmacéuticamente aceptables descritos en la presente especificación. Una formulación de hidrogel farmacéutica es útil para aplicaciones médicas y veterinarias. Una formulación de hidrogel farmacéutica puede administrarse a un individuo sola, o en combinación con otros ingredientes activos, agentes, fármacos u hormonas suplementarios.

Los aspectos de la presente especificación proporcionan, en parte, una formulación de hidrogel descrita en la presente especificación, que es una formulación de hidrogel farmacéutica que comprende un excipiente farmacológicamente aceptable. Tal y como se usa en la presente memoria, el término "excipiente farmacológicamente aceptable" es sinónimo de "excipiente farmacológico" o "excipiente" y se refiere a cualquier excipiente que no tiene sustancialmente ningún efecto perjudicial a largo plazo o permanente cuando se administra a un mamífero y engloba los compuestos tales como, por ejemplo, agente estabilizante, un agente de volumen, un crio-protector, un lio-protector, un aditivo, un vehículo, un portador, un diluyente o un auxiliar. Un excipiente se mezcla generalmente con un ingrediente activo o permite diluir o

incluir el ingrediente activo y puede ser un agente sólido, semi-sólido o líquido. También se prevé que una formulación de hidrogel farmacéutica puede incluir uno o más excipientes farmacéuticamente aceptables que facilitan el procesamiento de una formulación de hidrogel en una formulación de hidrogel farmacéuticamente aceptable. En el momento en el que cualquier excipiente farmacológicamente aceptable no sea compatible con una formulación de hidrogel, se contempla su uso en composiciones farmacéuticamente aceptables. Los ejemplos no limitativos de excipientes farmacológicamente aceptables pueden encontrarse, por ejemplo, en *Pharmaceutical Dosage Forms and Drug Delivery Systems* (Howard C. Ansel et al., eds., Lippincott Williams & Wilkins Publishers, 7ª ed. 1999); Remington: *The Science and Practice of Pharmacy* (Alfonso R. Gennaro ed., Lippincott, Williams & Wilkins, 20ª ed. 2000); Goodman & Gilman's *The Pharmacological Basis of Therapeutics* (Joel G. Hardman et al., eds., McGraw-Hill Professional, 10ª ed. 2001); y *Handbook of Pharmaceutical Excipients* (Raymond C. Rowe et al., APhA Publications, 4ª edición 2003).

Se prevé además que una formulación de hidrogel farmacéutica descrita en la presente especificación puede incluir opcionalmente o no incluir, sin limitación, otros componentes farmacéuticamente aceptables (o componentes farmacéuticos), incluyendo, sin limitación, tampones, conservantes, ajustadores de la tonicidad, sales, antioxidantes, agentes ajustadores de la osmolalidad, agentes emulsionantes, agentes humectantes, agentes edulcorantes o saporíferos, y semejantes.

El tampón farmacéuticamente aceptable es cualquier tampón que puede usarse para preparar una formulación de hidrogel farmacéutica descrita en la presente especificación, siempre que la preparación resultante sea farmacéuticamente aceptable. Los ejemplos no limitativos de tampones farmacéuticamente aceptables incluyen tampones acetato, tampones borato, tampones citrato, salinos tamponados neutros, tampones fosfato y salinos tamponados con fosfato. Cualquier concentración de un tampón farmacéuticamente aceptable puede ser útil en la formulación de una composición farmacéutica descrita en la presente especificación, con la condición de que se recupere una cantidad terapéuticamente eficaz del ingrediente activo de la matriz polimérica usando esta concentración eficaz de tampón. Los ejemplos no limitativos de concentraciones de tampones fisiológicamente aceptables ocurren en el intervalo de aproximadamente 0,1 mM a aproximadamente 900 mM. El pH de los tapones farmacéuticamente aceptables puede ajustarse, siempre que la preparación resultante sea farmacéuticamente aceptable. Se entiende que pueden usarse ácidos o bases para ajustar el pH de una composición farmacéutica según se necesite. Cualquier nivel de pH tamponado puede ser útil en la formulación de una formulación de hidrogel farmacéutica, con la condición de que se recupere una cantidad terapéuticamente eficaz de la formulación de hidrogel usando este nivel de pH eficaz. Los ejemplos no limitativos de pH fisiológicamente aceptable ocurren en el intervalo de aproximadamente pH 5,5 a aproximadamente pH 8,5.

Los antioxidantes farmacéuticamente aceptables incluyen, sin limitación, metabisulfito de sodio, tiosulfato de sodio, acetilcisteína, hidroxianisol butilado e hidroxitolueno butilado. Los conservantes farmacéuticamente aceptables incluyen, sin limitación, cloruro de benzalconio, clorobutanol, timerosal, acetato fenilmercúrico, nitrato fenilmercúrico, una composición estabilizada de oxi cloro, tal como, por ejemplo, PURITE® y quelantes, tal como, por ejemplo, DTPA o DTPA-bisamida, DTPA de calcio y CaNaDTPA-bisamida.

Los ajustadores de la tonicidad útiles en una formulación de hidrogel farmacéutica incluyen, sin limitación, sales tales como, por ejemplo, cloruro de sodio y cloruro de potasio; y glicerina. La formulación de hidrogel farmacéutica puede proporcionarse como una sal y puede formarse con muchos ácidos, incluyendo pero no limitado a, clorhídrico, sulfúrico, acético, láctico, tartárico, málico, succínico, etc. Las sales tienden a ser más solubles en disolventes acuosos u otros disolventes protónicos de lo que lo son las formas de base libre correspondientes. Se entiende que éstas y otras sustancias conocidas en la técnica de la farmacología pueden incluirse en una formulación de hidrogel farmacéutica descrita en la presente especificación. Otros ejemplos no limitativos de componentes farmacológicamente aceptables pueden encontrarse, por ejemplo, en Ansel, *supra*, (1999); Gennaro, *supra*, (2000); Hardman, *supra*, (2001); y Rowe, *supra*, (2003).

Una formulación de hidrogel descrita en la presente especificación se administra generalmente como una formulación de hidrogel farmacéutica aceptable. Tal y como se usa en la presente memoria, el término "farmacéuticamente aceptable" significa cualquier entidad molecular o composición que no produce una reacción adversa, alérgica u otra reacción inapropiada o no deseada cuando se administra a un individuo.

Los hidrogeles de seda según se proporcionan en la presente memoria pueden usarse para llenar jeringas y esterilizarse. Por ejemplo, la formulación salina de gel pulverizada puede cargarse en jeringas de 1 mL y cubrirse con agujas 26g. Éstas pueden almacenarse, por ejemplo, a 4°C, y esterilizarse, por ejemplo, en bolsas por exposición a radiación gamma con una dosis de 25 kGy. Después de la esterilización, las jeringas pueden almacenarse hasta un uso posterior en un intervalo de temperatura de 4°C a 37°C hasta el uso.

Así, por ejemplo, una formulación puede procesarse mediante la obtención de una disolución de seda al 8% (p/v), adición de etanol/23RGD para generar un hidrogel de fibroína de seda firme al 4%-6% (p/v), permitir a éste permanecer

- 5 durante al menos 24 horas, lavado del gel en agua para eliminar el potenciador libre residual (tanto 23RGD como etanol), adición de salino al gel y homogeneización de la suspensión, personalizando la viscosidad de la suspensión con la concentración del gel, tamaño de partícula y contenido salino, molienda del gel hasta un tamaño de partícula deseado que hace que el gel sea inyectable a través de una aguja 30g, carga del gel en una jeringa y esterilización del gel con irradiación gamma.
- Los hidrogeles de fibroína de seda descritos en la presente especificación pueden usarse en una variedad de usos médicos, incluyendo, sin limitación, rellenos para espacio tisular, moldes para la reconstrucción o regeneración de tejidos, soportes para células en aplicaciones de ingeniería de tejidos y para modelos de enfermedad, un recubrimiento superficial para mejorar la función de dispositivos médicos o como una plataforma para la administración de fármacos.
- 10 En cualquiera de los usos descritos más adelante, los geles de fibroína de seda podrían combinarse con células para los propósitos de una reparación biológicamente aumentada. Las células podrían recogerse de una multitud de huéspedes incluyendo pero no limitado a tejidos de autoinjerto humano, mamíferos transgénicos o cultivos bacterianos (posiblemente para uso como un tratamiento probiótico). Más específicamente, las células humanas usadas podrían consistir en células madre, osteocitos, fibroblastos, células neuronales, lipocitos e inmunocitos variados. Estas células se
- 15 añadirían mejor después de lavar el material de gel de seda en sí mismo. Podrían sembrarse en la superficie de un material de implante sólido o en el caso de inyectables de gel pulverizados, mezclarse en las partículas de gel de seda, disolución vehicular o mezcla de partículas de gel de seda y disolución vehicular antes de la inyección o implante.
- Además, los agentes terapéuticos, farmacéuticos o factores de crecimiento específicos añadidos al gel para propósitos de un resultado mejorado, podrían introducirse en cualquiera o una combinación de varios puntos a lo largo del proceso de producción del gel de seda. Estos factores podrían añadirse a la disolución de seda o la fase acelerante antes de la inducción de la gelificación, podrían incluirse en el gel durante el proceso de lavado del acelerante o podrían utilizarse para recubrir el gel bruto antes del lavado. Los geles que se muelen y utilizan un fluido vehicular también podrían tener un agente incluido en el gel después de la molienda, utilizarse para recubrir el gel después de la molienda o introducirse en el fluido vehicular antes o después de la mezcla con el material de gel.
- 20
- 25 Los hidrogeles de fibroína de seda descritos en la presente especificación pueden usarse como rellenos de espacio tisular, tal como, por ejemplo, un relleno dérmico. Una realización de la invención proporciona un relleno dérmico para proporcionar volumen dérmico para mejorar la apariencia o condición de la piel, incluyendo, sin limitación, rehidratar la piel, proporcionar una elasticidad incrementada a la piel, reducir la rugosidad de la piel, hacer la piel más firme, reducir o eliminar líneas o marcas de estiramiento, proporcionar a la piel un tono mejor, brillo, luminosidad y/o resplandor para
- 30 reducir la palidez, reducir o eliminar arrugas en la piel, proporcionar resistencia a las arrugas a la piel y semejantes. Un relleno dérmico que comprende un hidrogel de fibroína de seda puede modular la dureza y opacidad del gel mediante la alteración de la concentración de la seda y el método de formulación. La estrategia de formulación más probable implicaría moldeado de un gel de seda bruto, aproximadamente 2% (p/v) a aproximadamente 6% (p/v) de concentración de fibroína de seda que contiene un componente RGD en el intervalo de aproximadamente 0,1 a aproximadamente 10
- 35 moles de RGD por mol de seda en el material de gel. Este gel se molería a su vez de una manera tal que sea inyectable a través de una aguja 26-30g. Este gel molido se mezclará con un fluido vehicular, salino por ejemplo, con el fin de permitir una fuerza de extrusión apropiada de menos de 40 N (fuerza de inyección nominal administrable para una mano humana). Posiblemente, el contenido de vehículo en el caso de salino estará en el orden de 5% a 50% (v/v). Por ejemplo, puede requerirse una cantidad mayor (>25%) de adición de salino para aplicaciones en regiones dérmicas superficiales, tal como, por ejemplo, aplicaciones reconstructoras o cosméticas en la región facial de un individuo. Se obtendría un beneficio adicional a partir de la infusión de este fluido vehicular o gel con un analgésico u otro compuesto terapéutico. Además, el gel de fibroína de seda podría combinarse con células para propósitos de una reparación biológicamente aumentada.
- 40
- 45 Los aspectos de la presente especificación proporcionan, en parte, un método para mejorar una condición de la piel en un individuo que lo necesita, comprendiendo el método las etapas de administrar una formulación de hidrogel de fibroína de seda descrita en la presente especificación en una región dérmica del individuo, en el que la formulación comprende una fase de gel, incluyendo la fase de gel partículas de hidrogel que comprenden una fibroína de seda sustancialmente desprovista de sericina y un péptido anfílico; y una fase vehicular; y en el que la administración mejora la condición.
- 50 Los aspectos de la presente especificación proporcionan, en parte, un método para mejorar una apariencia de la piel en un individuo que lo necesita, comprendiendo el método las etapas de administrar una formulación de hidrogel de fibroína de seda descrita en la presente especificación en una región dérmica del individuo, en el que la formulación comprende una fase de gel, incluyendo la fase de gel partículas de hidrogel que comprenden una fibroína de seda sustancialmente desprovista de sericina y un péptido anfílico; y una fase vehicular; y en el que la administración mejora la apariencia de la piel.

Los aspectos de la presente invención proporcionan, en parte, una apariencia de la piel. Los ejemplos no limitativos de una apariencia de la piel incluyen arrugas de la piel, ausencia de firmeza de la piel, líneas y/o marcas de estiramiento de la piel y semejantes.

5 Los aspectos de la presente invención proporcionan, en parte, mejorar una apariencia de la piel. Los ejemplos no limitativos de mejorar una apariencia de la piel incluyen reducir o eliminar las arrugas de la piel, hacer la piel más firme, reducir o eliminar las líneas o marcas de estiramiento de la piel, proporcionar a la piel un tono mejor, brillo, luminosidad y/o resplandor para reducir la palidez y semejantes.

10 Los aspectos de la presente invención proporcionan, en parte, una condición de la piel. Los ejemplos no limitativos de una condición de la piel incluyen deshidratación, ausencia de elasticidad de la piel, rugosidad, ausencia de firmeza de la piel, líneas o marcas de estiramiento de la piel, palidez de la piel, arrugas en la piel y semejantes.

15 Los aspectos de la presente invención proporcionan, en parte, mejorar una condición de la piel. Los ejemplos no limitativos de mejorar una condición de la piel incluyen rehidratar la piel, proporcionar una elasticidad incrementada a la piel, reducir la rugosidad de la piel, hacer la piel más firme, reducir o eliminar las líneas o marcas de estiramiento, proporcionar a la piel un tono mejor, brillo, luminosidad y/o resplandor para reducir la palidez, reducir o eliminar las arrugas de la piel, proporcionar resistencia a las arrugas a la piel y semejantes.

20 Así, en una realización, un método para tratar una condición de la piel comprende la etapa de administrar a un individuo que padece una condición de la piel una formulación de hidrogel de fibroína de seda en el que la formulación comprende una fase de gel, incluyendo la fase de gel partículas de hidrogel que comprenden una fibroína de seda sustancialmente desprovista de sericina y un péptido anfílico; y una fase vehicular, y en el que la administración de la composición mejora la condición de la piel, tratando de esta manera la condición de la piel. En un aspecto de esta realización, un método para tratar la deshidratación de la piel comprende la etapa de administrar a un individuo que padece deshidratación de la piel una formulación de hidrogel de fibroína de seda en el que la formulación comprende una fase de gel, incluyendo la fase de gel partículas de hidrogel que comprenden una fibroína de seda sustancialmente desprovista de sericina y un péptido anfílico; y una fase vehicular, y en el que la administración de la composición rehidrata la piel, tratando de esta manera la deshidratación de la piel. En otro aspecto de esta realización, un método para tratar una ausencia de elasticidad de la piel comprende la etapa de administrar a un individuo que padece ausencia de elasticidad de la piel una formulación de hidrogel de fibroína de seda en el que la formulación comprende una fase de gel, incluyendo la fase de gel partículas de hidrogel que comprenden una fibroína de seda sustancialmente desprovista de sericina y un péptido anfílico; y una fase vehicular, y en el que la administración de la composición incrementa la elasticidad de la piel, tratando de esta manera una ausencia de elasticidad de la piel. En otro aspecto más de esta realización, un método para tratar rugosidad de la piel comprende la etapa de administrar a un individuo que padece rugosidad de la piel una formulación de hidrogel de fibroína de seda en el que la formulación comprende una fase de gel, incluyendo la fase de gel partículas de hidrogel que comprenden una fibroína de seda sustancialmente desprovista de sericina y un péptido anfílico; y una fase vehicular, y en el que la administración de la composición disminuye la rugosidad de la piel, tratando de esta manera la rugosidad de la piel. En otro aspecto más de esta realización, un método para tratar una ausencia de firmeza de la piel comprende la etapa de administrar a un individuo que padece ausencia de firmeza de la piel una formulación de hidrogel de fibroína de seda en el que la formulación comprende una fase de gel, incluyendo la fase de gel partículas de hidrogel que comprenden una fibroína de seda sustancialmente desprovista de sericina y un péptido anfílico; y una fase vehicular, y en el que la administración de la composición hace la piel más firme, tratando de esta manera una ausencia de firmeza de la piel.

45 En un aspecto adicional de esta realización, un método para tratar una línea o marca de estiramiento de la piel comprende la etapa de administrar a un individuo que padece una línea o marca de estiramiento de la piel una formulación de hidrogel de fibroína de seda en el que la formulación comprende una fase de gel, incluyendo la fase de gel partículas de hidrogel que comprenden una fibroína de seda sustancialmente desprovista de sericina y un péptido anfílico; y una fase vehicular, y en el que la administración de la composición reduce o elimina la línea o marca de estiramiento de la piel, tratando de esta manera una línea o marca de estiramiento de la piel. En otro aspecto de esta realización, un método para tratar palidez de la piel comprende la etapa de administrar a un individuo que padece palidez de la piel una formulación de hidrogel de fibroína de seda en el que la formulación comprende una fase de gel, incluyendo la fase de gel partículas de hidrogel que comprenden una fibroína de seda sustancialmente desprovista de sericina y un péptido anfílico; y una fase vehicular, y en el que la administración de la composición incrementa el tono o resplandor de la piel, tratando de esta manera la palidez de la piel. En otro aspecto de esta realización, un método para tratar arrugas en la piel comprende la etapa de administrar a un individuo que padece arrugas en la piel una formulación de hidrogel de fibroína de seda en el que la formulación comprende una fase de gel, incluyendo la fase de gel partículas de hidrogel que comprenden una fibroína de seda sustancialmente desprovista de sericina y un péptido anfílico; y una fase vehicular, y en el que la administración de la composición reduce o elimina las arrugas de la piel, tratando de esta manera las arrugas de la piel. En otro aspecto más de esta realización, un método para tratar arrugas en la piel comprende la etapa de administrar a un individuo una formulación de hidrogel de fibroína de seda en el que la

formulación comprende una fase de gel, incluyendo la fase de gel partículas de hidrogel que comprenden una fibroína de seda sustancialmente desprovista de sericina y un péptido anfílico; y una fase vehicular, y en el que la administración de la composición hace que la piel sea resistente a las arrugas de la piel, tratando de esta manera las arrugas de la piel.

5 Los aspectos de la presente invención proporcionan, en parte, una región dérmica. Tal y como se usa en la presente memoria, el término "región dérmica" se refiere a la región de la piel que comprende la unión epidérmica-dérmica y la dermis incluyendo la dermis superficial (región papilar) y la dermis profunda (región reticular). La piel está compuesta por tres capas principales: la epidermis, que proporciona resistencia al agua y funciona como una barrera a la infección; la dermis, que funciona como una localización para los anexos de la piel; y la hipodermis (capa adiposa subcutánea). La epidermis no contiene vasos sanguíneos y esta alimentada por la difusión de la dermis. El tipo principal de células que forma la epidermis son queratinocitos, melanocitos, células de Langerhans y células Merckels.

10 La dermis es la capa de la piel que está por debajo de la epidermis que consiste en tejido conectivo y protege al cuerpo del esfuerzo y deformación. La dermis está conectada firmemente a la epidermis por una membrana basal. También alberga muchas terminaciones mecanorreceptoras/nerviosas que proporcionan el sentido del tacto y calor. Contiene los folículos pilosos, glándulas sudoríparas, glándulas sebáceas, glándulas apocrinas, vasos linfáticos y vasos sanguíneos. 15 Los vasos sanguíneos en la dermis proporcionan alimento y eliminación de desecho a sus propias células así como del estrato basal de la epidermis. La dermis está dividida estructuralmente en dos áreas: un área superficial adyacente a la epidermis, denominada la región papilar, y un área gruesa más profunda conocida como la región reticular.

20 La región papilar está compuesta por tejido conectivo areolar laxo. Se denomina así por sus proyecciones semejantes a dedos denominadas papilas que se extienden hacia la epidermis. Las papilas proporcionan a la dermis una superficie "desigual" que se imbrica con la epidermis, reforzando la conexión entre las dos capas de la piel. La región reticular se encuentra muy dentro de la región papilar y es habitualmente más gruesa. Está compuesta por tejido conectivo irregular denso, y recibe su nombre de la concentración densa de fibras colagenosas, elásticas y reticulares que se entrecruzan a lo largo de ella. Estas fibras proteicas proporcionan a la dermis sus propiedades de fuerza, extensibilidad y elasticidad. 25 En la región reticular también están localizadas las raíces del pelo, glándulas sebáceas, glándulas sudoríparas, receptores, uñas y vasos sanguíneos. La tinta de los tatuajes se mantiene en la dermis. Las marcas de estiramiento (estrías) del embarazo también están localizadas en la dermis.

30 La hipodermis no es parte de la piel y se encuentra por debajo de la dermis. Su propósito es unir la piel al hueso y músculo subyacente así como suministrar a ésta con vasos sanguíneos y nervios. Consiste en tejido conectivo laxo y elastina. Los tipos principales de células son fibroblastos, macrófagos y adipocitos (la hipodermis contiene el 50% de la grasa corporal). La grasa sirve como relleno y aislamiento para el cuerpo.

Los aspectos de la presente invención proporcionan, en parte, un individuo. Tal y como se usa en la presente memoria el término "individuo" se refiere a cualquier mamífero incluyendo un ser humano.

35 Los aspectos de la presente invención proporcionan, en parte, administrar una formulación del hidrogel de fibroína de seda descrita en la presente especificación. Tal y como se usa en la presente memoria, el término "administrar" significa cualquier mecanismo de administración que proporciona una formulación de hidrogel de fibroína de seda en el que la formulación comprende una fase de gel, incluyendo la fase de gel partículas de hidrogel que comprenden una fibroína de seda sustancialmente desprovista de sericina y un péptido anfílico; y una fase vehicular a un individuo que resulta potencialmente en un resultado clínicamente, terapéuticamente o experimentalmente beneficioso. El mecanismo real de administración usado para administrar una formulación del hidrogel de fibroína de seda descrita en la presente especificación a un individuo puede ser determinado por un experto en la técnica teniendo en cuenta factores, 40 incluyendo, sin limitación, el tipo de condición de la piel, la localización de la condición de la piel, la causa de la condición de la piel, la gravedad de la condición de la piel, el grado de alivio deseado, la duración de alivio deseada, la formulación de hidrogel de fibroína de seda particular usada, la velocidad de excreción de la formulación de hidrogel de fibroína de seda particular usada, la farmacodinámica de la formulación de hidrogel de fibroína de seda particular usada, la naturaleza de los demás compuestos incluidos en la formulación de hidrogel de fibroína de seda particular usada, la ruta particular de administración, las características particulares, historial y factores de riesgo del individuo, tal como, por ejemplo, edad, peso, salud general y semejantes, o cualquier combinación de éstas. 45

50 Así, en una realización, una formulación de hidrogel de fibroína de seda en la que la formulación comprende una fase de gel, incluyendo la fase de gel partículas de hidrogel que comprenden una fibroína de seda sustancialmente desprovista de sericina y un péptido anfílico; y una fase vehicular, se administra a una región de la piel de un individuo. En un aspecto de esta realización, una formulación de hidrogel de fibroína de seda en la que la formulación comprende una fase de gel, incluyendo la fase de gel partículas de hidrogel que comprenden una fibroína de seda sustancialmente desprovista de sericina y un péptido anfílico; y una fase vehicular, se administra a una región de la piel de un individuo por inyección. En otro aspecto de esta realización, una formulación de hidrogel de fibroína de seda en la que la formulación comprende una fase de gel, incluyendo la fase de gel partículas de hidrogel que comprenden una fibroína de 55

5 seda sustancialmente desprovista de sericina y un péptido anfílico; y una fase vehicular, se administra a una región de la piel de un individuo por inyección en una región dérmica. En aspectos de esta realización, una formulación de hidrogel de fibroína de seda en la que la formulación comprende una fase de gel, incluyendo la fase de gel partículas de hidrogel que comprenden una fibroína de seda sustancialmente desprovista de sericina y un péptido anfílico; y una fase vehicular, se administra a una región de la piel de un individuo por inyección, por ejemplo, en una región de unión epidérmica-dérmica, una región papilar, una región reticular o cualquier combinación de éstas.

10 En otra realización, la invención proporciona un relleno dérmico para proporcionar volumen dérmico para reconstruir o aumentar una parte corporal de tejido blando, por ejemplo, un labio, una mama, la parte de una mama como el pezón, un músculo, o cualquier otra parte corporal de tejido blando en el que se usa tejido adiposo y/o conectivo para proporcionar forma, aislamiento u otra función biológica. En los rellenos usados para estas aplicaciones, la concentración de fibroína de seda y la cantidad de adición de salino al hidrogel de fibroína de seda pueden ajustarse para ser compatibles con las restricciones relevantes de un entorno biológico dado. Por ejemplo, un gel para aumento de pecho requerirá la modulación de la dureza y longevidad del gel mediante la alteración de la concentración de seda y el método de formulación. La estrategia de formulación más probable conllevará moldeado de un gel de seda bruto, aproximadamente 15 4% (p/v) a aproximadamente 8% (p/v) de concentración de fibroína de seda que contiene un componente RGD en el intervalo de aproximadamente 0,1 a aproximadamente 10 moles de RGD por mol de seda en el material de gel. El contenido probable de vehículo en el caso de salino estará en el orden de 0% a 25% (v/v). Dichas estrategias de formulación también deberán considerar otros factores tales como, por ejemplo, tipo de defecto, tamaño del defecto y necesidades para una profundidad específica de la administración del relleno. El tamaño de las partículas y la uniformidad de los hidrogeles pueden controlarse de manera que el implante del tejido pueda conseguirse mediante inyección. Por ejemplo, para inyección dérmica y aumento de labios, se usará una aguja de jeringa con un tamaño 20 26g-30g. En las aplicaciones que implican grandes cantidades de relleno, por ejemplo, reconstrucción o aumento de mama, puede usarse un tamaño de partícula mayor y un calibre de aguja mayor como 23g-27g para administrar el relleno. Este gel molido debe mezclarse con un fluido vehicular, salino por ejemplo, con el fin de permitir una fuerza de extrusión apropiada de menos de 40 N (fuerza de inyección nominal administrable para una mano humana). Se obtendrá un beneficio adicional a partir de la infusión de este fluido vehicular o gel con un analgésico u otro compuesto terapéutico. Además, una formulación de hidrogel de fibroína de seda descrita en la presente especificación puede usarse para rellenar un dispositivo médico implantable expandible, tal como, por ejemplo, una cubierta de implante de mama expandible.

30 Los aspectos de la presente especificación proporcionan, en parte, un método de reconstrucción o aumento de tejido blando, comprendiendo el método la etapa de administrar una formulación de hidrogel de fibroína de seda a una región de tejido blando de un individuo que necesita una reconstrucción o aumento de tejido blando; en el que la formulación comprende una fase de gel, incluyendo la fase de gel partículas de hidrogel que comprenden una fibroína de seda sustancialmente desprovista de sericina y un péptido anfílico; y una fase vehicular.

35 Los aspectos de la presente especificación proporcionan, en parte, un método de reconstrucción o aumento de tejido blando, comprendiendo el método la etapa de poner un dispositivo médico implantable en una región de tejido blando de un individuo en la localización deseada; y expandir el dispositivo poniendo una formulación de hidrogel de fibroína de seda en el dispositivo, en el que la formulación comprende una fase de gel, incluyendo la fase de gel partículas de hidrogel que comprenden una fibroína de seda sustancialmente desprovista de sericina y un péptido anfílico; y una fase 40 vehicular, en el que el relleno del dispositivo médico reconstruye o aumenta el tejido blando.

Los aspectos de la presente especificación proporcionan, en parte, un tejido blando. Los ejemplos no limitativos de tejido blando incluyen un labio, una mama, la parte de una mama como el pezón, un músculo o cualquier otra parte corporal de tejido blando en la que se usa tejido adiposo y/o conectivo para proporcionar forma, aislamiento u otra función biológica.

45 La reconstrucción del tejido blando es la reposición de la estructura de un tejido blando que ha sido dañado gravemente o se ha perdido, por ejemplo, por un accidente dramático o eliminación quirúrgica. Por ejemplo, la reconstrucción de la mama es la reposición de una mama, habitualmente en mujeres. Implica usar tejido autólogo o material prostético para construir una mama con aspecto natural. Habitualmente, esto incluye la reformación de una aureola y pezón con aspecto natural. Este procedimiento implica el uso de implantes o colgajos relocados del propio tejido del paciente.

50 El aumento de tejido blando es la alteración de la estructura de un tejido blando habitualmente para mejorar la apariencia cosmética o estética del tejido blando. Por ejemplo, el aumento de mama (también conocido como aumento de mama, agrandamiento de mama, agrandamiento por mamoplastia, mamoplastia de aumento) altera el tamaño y forma de las mamas de una mujer para mejorar la apariencia cosmética o estética de la mujer.

La administración subdérmica se refiere a la administración de las formulaciones de hidrogel descritas en la presente especificación por debajo de la capa dérmica, por ejemplo, en la hipodermis o en tejido muscular.

Los hidrogeles de fibroína de seda descritos en la presente especificación pueden usarse conjuntamente con procedimientos de embolización por radiología intervencionista para bloquear los vasos sanguíneos (arteria) (por ejemplo, para el propósito de parar una hemorragia) u órganos (para parar la función extra, por ejemplo, embolización del bazo para hiperesplenismo) anormales incluyendo embolización arterial uterina para el tratamiento percutáneo de fibroides uterinos. La modulación de la dureza y longevidad del gel se haría mediante la alteración de la concentración de seda y el método de formulación. La estrategia de formulación más probable conllevará moldeado de un gel de seda bruto, aproximadamente 1% (p/v) a aproximadamente 4% (p/v) de concentración de seda que contiene un componente RGD en el intervalo de aproximadamente 0,01 a aproximadamente 3 moles de RGD por mol de fibroína seda en el material de gel. Este gel se molería a su vez de manera tal que sea inyectable a través de una aguja 26-30g. Este gel molido podría mezclarse con un fluido vehicular, salino por ejemplo, con el fin de permitir una fuerza de extrusión apropiada de menos de 40 N (fuerza de inyección nominal administrable para una mano humana). El contenido de vehículo en el caso de salino estará en el orden de 0% a 25% (v/v). Se obtendría un beneficio adicional a partir de la infusión de este fluido vehicular o gel con un compuesto terapéutico tal como un agente de coagulación. Además, el gel de fibroína de seda podría combinarse con células para propósitos de una reparación biológicamente aumentada.

Los hidrogeles de fibroína de seda descritos en la presente especificación pueden usarse para reparar el espacio hueco creado por la cirugía de eliminación de núcleos de discos espinales para ayudar a mantener la distancia normal entre los cuerpos vertebrales adyacentes. Como una alternativa adicional, pueden generarse hidrogeles de seda con una mayor concentración de proteína de seda (por ejemplo, 20% (p/v)) en un molde diseñado a medida. El dispositivo resultante puede implantarse sin fluido vehicular o molienda como un reemplazo de los discos vertebrales enfermos eliminados por el procedimiento quirúrgico. Para esta aplicación, el hidrogel de seda puede entrecruzarse además químicamente o físicamente para obtener propiedades mecánicas más fuertes. Además, el gel de fibroína de seda podría combinarse con células para propósitos de una reparación biológicamente aumentada.

En un aspecto de esta realización, sería deseable emplear un relleno de disco vertebral que comprende una concentración de seda de aproximadamente 4% a aproximadamente 6% (p/v) en el gel de seda. Este material se molería hasta un inyectable después de moldeado y mezcla con 0% a aproximadamente 20% (v/v) de fluido vehicular y se inyectaría en un disco roto durante la gelificación. El contenido apropiado de RGD para este material estaría en el orden de aproximadamente 0,0001 a aproximadamente 0,01 moles de RGD por mol de seda en el material de gel o en el orden de aproximadamente 5 a aproximadamente 100 moles de RGD por mol de seda en el gel. Un componente RGD pequeño o un componente RGD muy grande podrían ser ambos muy útiles para evitar la proliferación celular bien mediante la denegación de restos de unión o mediante el suministro de tantos como células de anclaje e impedir la capacidad de moverse y proliferar.

En otro aspecto de esta realización, sería deseable moldear un gel de seda en un molde anular con la forma apropiada para el reemplazo completo del disco. Este gel emplearía una concentración de seda de aproximadamente 6% (p/v) a aproximadamente 10% (p/v) en el material de gel en sí mismo. Un contenido apropiado de RGD estaría en el orden de aproximadamente 0,1 a aproximadamente 3 moles de RGD por mol de seda para estimular el crecimiento hacia adentro del tejido huésped en el material. Este dispositivo podría implantarse entonces in situ.

En otro aspecto de esta realización, sería deseable emplear un gel de seda que se inyecta en el disco defectuoso y gelifica en su sitio. Este gel emplearía una concentración de seda de aproximadamente 4% (p/v) a aproximadamente 10% (p/v) en el material de gel. El acelerante podría mezclarse con la disolución de seda antes, durante o después de la inyección en el sitio de interés. Una baja concentración de acelerante sería deseable para esta aplicación. El contenido apropiado de RGD para este material estaría en el orden de aproximadamente 0,0001 a aproximadamente 0,01 moles de RGD por mol de seda en el material de gel o en el orden de aproximadamente 5 a aproximadamente 100 moles de RGD por mol de seda en el gel. Un componente RGD pequeño o un componente RGD muy grande podrían ser ambos muy útiles para evitar la proliferación celular bien mediante la denegación de restos de unión o mediante el suministro de tantos como células de anclaje e impedir la capacidad de moverse y proliferar.

Los hidrogeles de fibroína de seda descritos en la presente especificación pueden usarse para llenar la cavidad vítrea para soportar la estructura del globo ocular y mantener la posición de la retina. Para esta aplicación, el implante comprendería una concentración baja de fibroína de seda, sería altamente transparente y podría modificarse para ser más bioinerte, es decir, inhibir el crecimiento hacia dentro y proliferación celulares, mediante un tratamiento adicional, por ejemplo, mediante una alta dosificación de 23RGD. Por ejemplo, el gel de fibroína de seda usado como relleno para la cavidad vítrea conllevaría moldeado de un gel de seda bruto de aproximadamente 0,5% (p/v) a aproximadamente 2% (p/v) de concentración de seda que contiene un componente RGD en el intervalo de 0,0001 a 1 mol de RGD por mol de seda en el material de gel o en el orden de 5 a 100 moles de RGD por mol de seda en el gel. Un componente RGD pequeño o un componente RGD muy grande podrían ser ambos muy útiles para evitar la proliferación celular bien mediante la denegación de restos de unión o mediante el suministro de tantos como células de anclaje e impedir la capacidad de moverse y proliferar. Este gel podría molerse para convertirlo en inyectable o podría ser inyectable como un todo dependiendo de la dureza del material, aunque debe ser inyectable a través de una aguja 26-30g con una fuerza

de extrusión apropiada de menos de 40 N. El contenido probable del vehículo estaría en el orden de 0% a aproximadamente 95% (v/v). La composición del vehículo podría ser cualquier líquido biológicamente o anatómicamente útil y puede consistir en salino, gel de ácido hialurónico y fluidos biológicos derivados del huésped o no derivados del huésped.

5 Los hidrogeles de fibroína de seda descritos en la presente especificación pueden usarse como moldes para la reconstrucción o regeneración de tejidos. En general, pueden generarse hidrogeles con alta concentración de fibroína de seda con propiedades mecánicas fuertes y elasticidad en una cámara de molde diseñada a medida para formarlo en la forma deseada requerida. En un caso en el que el gel de seda se usa como un molde para la reconstrucción o regeneración de tejidos, la aplicación final del material debería considerarse en la selección de una formulación. El dispositivo puede moldearse y colarse o moldearse y reformarse e implantarse para la reconstrucción de tejidos. Además, el gel de fibroína de seda podría combinarse con células para propósitos de una reparación biológicamente aumentada.

10 En una realización el hidrogel de seda puede implantarse en la localización del defecto del cartílago (como de los meniscos o cartílago meniscal) o del hueso. El dispositivo de hidrogel de seda facilitaría el crecimiento hacia dentro y proliferación celulares en el cartílago/hueso y soportaría la deposición de la matriz de colágeno para mejorar de esta manera la reparación del cartílago/hueso. En otro aspecto, antes del implante, las células de cartílago donantes pueden sembrarse o mezclarse con hidrogel de seda y cultivarse *in vitro* para expandir la población celular y para desarrollar el tejido del cartílago para acortar de esta manera el periodo de tiempo de la cicatrización. Para esta aplicación, pueden añadirse al hidrogel de seda factores de crecimiento específicos tales como TGF- β o proteínas óseas morfogénicas (BMP) que soportan la formación del tejido de cartílago o hueso, respectivamente. Los geles de seda usados para el reemplazo de un defecto de hueso o cartílago deben moldearse con una concentración de seda de aproximadamente 6% (p/v) a aproximadamente 10% (p/v) de fibroína de seda. El componente RGD debe estar en el intervalo de aproximadamente 0,01 a aproximadamente 3 moles de RGD por mol de seda en el material de gel. Estos materiales podrían moldearse en un molde y de esta manera darles forma para una aplicación apropiada o podrían moldearse en una forma genérica y refinarse adicionalmente por el usuario final del material antes del implante.

15 En otra realización, los hidrogeles de fibroína de seda pueden usarse para cirugía plástica facial, tal como, por ejemplo, reconstrucción nasal. La estrategia de formulación discutida anteriormente para reparar un defecto de cartílago/hueso también sería aplicable para esta aplicación.

20 Los hidrogeles de fibroína de seda descritos en la presente especificación pueden usarse como soportes para soportar el crecimiento celular para aplicaciones de ingeniería de tejidos o investigación de modelos de enfermedad.

25 En un aspecto, los soportes de hidrogel que comprenden células pueden usarse en métodos para estimular la cicatrización de heridas o el cierre de heridas, por ejemplo, en un sitio de incisión. Los métodos comprenden generalmente implantar un hidrogel, por ejemplo, un hidrogel bioerosionable o bioresorbible como se describe en la presente especificación, en el sitio de la herida o incisión y permitir que la herida o incisión cicatrice mientras el implante se erosiona o absorbe en el cuerpo y es reemplazado por el tejido viable propio del individuo. Los métodos pueden comprender además la etapa de sembrar el hidrogel con material celular viable, bien del individuo o de un donante, antes de o durante el implante.

30 En otro aspecto, los soportes de hidrogel que comprenden células pueden usarse en métodos para aumentar o reconstruir la mama de un ser humano. Por ejemplo, un método para aumentar el soporte de un implante de mama convencional, tal como, aumentando el soporte de la posición del polo inferior de un implante de mama. Como otro ejemplo, el método comprende generalmente las etapas de implantar un soporte de hidrogel cerca o en la proximidad de un implante de mama, por ejemplo, un implante de mama convencional, y sembrar el hidrogel con material celular viable antes de o durante el implante. Como otro ejemplo más, un soporte de hidrogel se usa para cubrir parcialmente o completamente un implante de mama para proporcionar una interfase beneficiosa con el tejido del huésped y para reducir el potencial de posición incorrecta o contractura capsular.

35 En otro aspecto más, los soportes de hidrogel que comprenden células pueden usarse en métodos para proporcionar una interfase beneficiosa entre el tejido del huésped y una prótesis, por ejemplo, un implante de mama. En algunas realizaciones, las matrices están estructuradas para ser eficaces en la reducción del potencial de posición incorrecta o contractura capsular de los implantes de mama. Por ejemplo, se proporcionan métodos para aumentar o reconstruir una mama humana, comprendiendo generalmente los métodos: proporcionar una cobertura parcial o completa de los implantes de mama en el que la cobertura parcial o completa comprende un soporte de hidrogel que comprende células. En algunas realizaciones, el hidrogel tiene una configuración semejante a una envoltura en un implante de mama convencional relleno de silicona o salino convencional. Los métodos pueden comprender además la etapa de sembrar el hidrogel con material celular viable antes de o durante el implante.

En otro aspecto más, los soportes de hidrogel de fibroína de seda descritos en la presente especificación pueden usarse como el soporte para células útil para la reparación de nervios periféricos. Los hidrogeles de seda pueden implantarse en la localización del defecto nervioso con o sin un dispositivo adicional para ayudar en la conexión con las terminaciones nerviosas. Para esta estrategia, pueden añadirse factores de crecimiento específicos tales como el factor de crecimiento nervioso (NGF), que soporta la regeneración nerviosa. Alternativamente, las células nerviosas pueden mezclarse con el hidrogel de seda y expandirse por cultivo *in vitro* antes del implante. Existen dos estrategias de formulación posibles en un caso en el que el gel de fibroína de seda se usa como molde para la reparación de nervios periféricos. La primera implica el uso de un gel de seda más blando de aproximadamente 0,5 (p/v) a aproximadamente 3% (p/v) de seda bien moldeado con forma como una parte de soporte nervioso o molido para ser extruible como una parte de soporte nervioso. Este material se infundiría con factores terapéuticos apropiados según los métodos descritos anteriormente. La segunda formulación posible de este molde usaría el gel blando descrito anteriormente recubierto por una cubierta o conducto de gel de fibroína de seda de mayor fuerza de aproximadamente 3 a aproximadamente 8% de seda. Esto podría generarse mediante una técnica de co-moldeado o rellenando un conducto moldeado con un material de gel central inyectable. En el caso de todos los geles, sería apropiado un contenido de RGD de aproximadamente 0,01 a aproximadamente 3 moles de RGD por mol de seda. Si se empleara un fluido vehicular, una concentración entre 0% y aproximadamente 25% (v/v) sería la más apropiada.

Las células pueden sembrarse en la superficie de una material de implante sólido que comprende un hidrogel descrito en la presente especificación usando una variedad de métodos. Por ejemplo, un soporte de hidrogel puede sumergirse en un medio de crecimiento apropiado para las células de interés y exponerse directamente a las células. Se deja que las células proliferen en la superficie e intersticios del hidrogel. El hidrogel se quita del medio de crecimiento, se lava si es necesario y se implanta. Alternativamente, las células pueden ponerse en un tampón o medio de crecimiento líquido adecuado y sacarse a través de un soporte de hidrogel usando filtración en vacío. Las células también pueden mezclarse con un precursor de un soporte de hidrogel y el soporte de hidrogel puede construirse alrededor de las células, capturando al menos parte de las células en la red del soporte de hidrogel. En otra realización, las células de interés se disuelven en una disolución apropiada (por ejemplo, un medio de crecimiento o tampón) y se pulverizan en un soporte de hidrogel mientras el soporte de hidrogel se está formando por electrohilado. Este método es particularmente adecuado cuando se desea una matriz altamente celularizada. Las células también pueden electropulverizarse en un soporte de hidrogel durante el electrohilado. Como se describe actualmente, la electropulverización implica someter una disolución que contiene células con una viscosidad y concentración apropiadas a un campo eléctrico suficiente para producir una pulverización de gotitas pequeñas cargadas de disolución que contienen células.

En determinados casos, un soporte de hidrogel sólido puede prepararse como un material poroso que comprende un hidrogel definido por una matriz interconectada de poros. El tamaño de los poros que comprenden una matriz interconectada de poros debería ser de un tamaño suficiente para facilitar el crecimiento hacia dentro del tejido. Dicha matriz de hidrogel porosa puede prepararse usando procedimientos estándar tal como, porógenos u otros materiales filtrables. Dichos materiales incluyen, sin limitación, sales como cloruro de sodio, cloruro de potasio, cloruro de calcio, tartrato de sodio, citrato de sodio, y semejantes; mono y disacáridos biocompatibles como glucosa, fructosa, dextrosa, maltosa, lactosa y sacarosa); polisacáridos como almidón, alginato, quitosán; y proteínas solubles en agua como gelatina y agarosa. Los porógenos y otros materiales filtrables pueden eliminarse sumergiendo el hidrogel con el material filtrable en un disolvente en el que la partícula es soluble durante una cantidad de tiempo suficiente para permitir la filtración de sustancialmente todas las partículas, pero que no disuelve o altera perjudicialmente el hidrogel. En una realización, el hidrogel puede secarse después de que el proceso de filtrado se completa a una temperatura baja y/o vacío para minimizar la hidrólisis de la matriz a no ser que se desee una degradación acelerada de la matriz. Los métodos útiles para preparar porógenos u otros materiales filtrables así como los métodos para preparar un biomaterial poroso que puede modificarse para uso tomando como base la descripción contenida en la presente especificación se describen, por ejemplo, en Ma, *Reverse Fabrication of Porous Materials*, Patente U.S. 6.673.285; Ma, *Reverse Fabrication of Porous Materials*, Publicación de Patente U.S. 2002/0005600; Ratner y Marshall, *Novel Porous Materials*, Publicación de Patente U.S. 2008/0075752; Ma, *Modified Porous Materials and Method of Forming the Same*, Publicación de Patente U.S. 2008/0213564; Ma, et al., *Porous Objects Having Immobilized Encapsulated Biomolecules*, Publicación de Patente U.S. 2008/0317816; Hunter, et al., *Soft Tissue Implants and Anti-Scarring Agents*, Publicación de Patente U.S. 2009/0214652; Liu, et al., *Porous Materials, Methods of Making and Uses*, Expediente de Abogado Número 18614 PROV (BRE); y Liu, et al., *Porous Materials Methods of Making and Uses*, Expediente de Abogado Número 18707PROV (BRE).

En una realización, un soporte de hidrogel sólido puede prepararse como un material poroso que comprende un hidrogel definido por una matriz interconectada de poros. En aspectos de esta realización, los poros que comprenden la matriz interconectada de poros tienen un diámetro medio de poro en el intervalo, por ejemplo, de aproximadamente 10 μm a aproximadamente 1.000 μm , aproximadamente 200 μm a aproximadamente 800 μm , aproximadamente 300 μm a aproximadamente 700 μm o aproximadamente 50 μm a aproximadamente 200 μm .

Alternativamente, las células podrían mezclarse en una formulación de hidrogel que comprende partículas de hidrogel de fibroína de seda, disolución vehicular o mezcla de partículas de hidrogel de fibroína de seda y una disolución vehicular

antes de la inyección o implante. Pueden añadirse a los hidrogeles de seda factores de crecimiento u otras proteínas de la matriz tales como colágeno, fibronectina, para facilitar el crecimiento, diferenciación celular, formación de tejido y deposición de la matriz funcional. Después del implante, el hidrogel o las partículas de hidrogel incluidas en las formulaciones de hidrogel que comprenden células pueden ser absorbidas en el cuerpo en el tiempo. Esta absorción puede coincidir con el reemplazo del tejido infiltrante del material de hidrogel. Así, un soporte de hidrogel puede proporcionar un sustrato temporal, bien definido para el crecimiento hacia dentro de un tejido durante la cicatrización de heridas y reconstrucción o aumento de tejido blando. Los soportes de hidrogel descritos que comprenden células también pueden proporcionar una fuerza inmediata a un sitio de incisión o sitio de reconstrucción o aumento de tejido blando.

En una realización, un soporte de hidrogel que comprende células es bioerosionable o bioresorbible. En aspectos de esta realización, un soporte de hidrogel que comprende células se bioerosiona o bioresorbe, por ejemplo, aproximadamente 10 días, aproximadamente 20 días, aproximadamente 30 días, aproximadamente 40 días, aproximadamente 50 días, aproximadamente 60 días, aproximadamente 70 días, aproximadamente 80 días o aproximadamente 90 días después de la administración. En otros aspectos de esta realización, un soporte de hidrogel que comprende células se bioerosiona o bioresorbe, por ejemplo, aproximadamente 10 días o más, aproximadamente 20 días o más, aproximadamente 30 días o más, aproximadamente 40 días o más, aproximadamente 50 días o más, aproximadamente 60 días o más, aproximadamente 70 días o más, aproximadamente 80 días o más o aproximadamente 90 días o más después de la administración. En otros aspectos más de esta realización, un soporte de hidrogel que comprende células se bioerosiona o bioresorbe, por ejemplo, aproximadamente 10 días a aproximadamente 30 días, aproximadamente 20 días a aproximadamente 50 días, aproximadamente 40 días a aproximadamente 60 días, aproximadamente 50 días a aproximadamente 80 días o aproximadamente 60 días a aproximadamente 90 días después de la administración.

Los aspectos de la presente especificación proporcionan, en parte, un componente celular. Las células podrían recogerse de una multitud de huéspedes incluyendo pero no limitado a tejidos de autoinjerto humano, mamíferos transgénicos o cultivos bacterianos (posiblemente para uso como un tratamiento probiótico). En determinados casos, el soporte de hidrogel puede comprender células madre humanas tales como, por ejemplo, células madre mesenquimáticas, células madre derivadas de sinovio, células madre embrionarias, células madre adultas, células de la sangre del cordón umbilical, células de gelatina de Wharton umbilicales, osteocitos, fibroblastos, células neuronales, lipocitos, células de la médula ósea, inmunocitos variados, células precursoras derivadas de tejido adiposo, células progenitoras derivadas de la médula ósea, células progenitoras de sangre periférica, células madre aisladas de tejido adulto y células transformadas genéticamente o combinaciones de las células anteriores; o células diferenciadas tales como, por ejemplo, células musculares, células adiposas. Las células se añaden mejor después de lavar el material de hidrogel de seda después de la gelificación. Las células madre pueden obtenerse con procedimientos mínimamente invasivos de médula ósea, tejido adiposo u otras fuentes en el cuerpo, y son altamente expandibles en cultivo, y pueden inducirse fácilmente para que se diferencien en células formadoras de tejido adiposo después de exposición a un suplemento inductor adipogénico bien establecido. Alternativamente, pueden sembrarse células enfermas tales como células cancerosas y cultivarse en hidrogeles de seda. El hidrogel de seda sembrado puede usarse como un sistema de modelo para estudiar el mecanismo de la enfermedad y para evaluar las soluciones potenciales para curar las enfermedades. Las células pueden añadirse a un hidrogel y cultivarse *in vitro* para crecer tejido o añadirse a un hidrogel e implantarse en una región del cuerpo. Las células pueden sembrarse en el hidrogel durante un periodo corto de tiempo (menos de 1 día) justo antes del implante o cultivarse durante un periodo mayor (más de 1 día) para permitir la proliferación celular y la síntesis de la matriz extracelular en la matriz sembrada antes del implante.

Cuando se utiliza como una fuente de células madre, el tejido adiposo puede obtenerse por cualquier método conocido para un experto en la técnica. Por ejemplo, el tejido adiposo puede extraerse de un individuo por lipoplastia asistida por succión, lipoplastia asistida por ultrasonidos y lipectomía escisional. Además, los procedimientos pueden incluir una combinación de dichos procedimientos. La lipoplastia asistida por succión puede ser deseable para extraer el tejido adiposo de un individuo ya que proporciona un método mínimamente invasivo para recoger tejido con un potencial mínimo de daño a las células madre que puede estar asociado con otras técnicas, tales como lipoplastia asistida por ultrasonidos. El tejido adiposo debe recogerse de una manera que preserve la viabilidad del componente celular y que minimice la probabilidad de contaminación del tejido con organismos potencialmente infecciosos, tales como bacterias y/o virus.

Para algunas aplicaciones, la preparación de la población de células activas puede requerir la depleción del componente de adipocito rico en grasa maduro del tejido adiposo. Esto se consigue típicamente por una serie de etapas de lavado y disgregación en las que el tejido se lava en primer lugar para reducir la presencia de lípidos libres (liberados de adipocitos rotos) y elementos de sangre periférica (liberados de vasos sanguíneos dañados durante la recogida de tejido) y se disgrega a adipocitos libres intactos y otras poblaciones celulares de la matriz de tejido conectivo. La disgregación puede conseguirse usando cualquier técnica o método convencional, incluyendo fuerza mecánica (triturado o fuerzas de cizalla), digestión enzimática con enzimas proteolíticas únicas o combinadas, tales como colagenasa,

tripsina, lipasa, liberasa H1 y pepsina, o una combinación de métodos mecánicos y enzimáticos. Por ejemplo, el componente celular de los fragmentos de tejido intactos puede disgregarse por métodos que usan disociación mediada por colagenasa del tejido adiposo, similares a los métodos para recoger células del endotelio microvascular en el tejido adiposo, según conocen los expertos en la técnica. Los métodos adicionales que usan colagenasa que pueden usarse también son conocidos para los expertos en la técnica. Además, los métodos pueden emplear una combinación de enzimas, tal como una combinación de colagenasa y tripsina o una combinación de una enzima, tal como tripsina, y disociación mecánica.

La población de células activas (lipoaspirado procesado) puede obtenerse a partir de fragmentos de tejido disgregado reduciendo la presencia de adipocitos maduros. La separación de las células puede conseguirse por sedimentación en gradiente de densidad, centrifugación, elutriación, adherencia diferencial a y elución de restos de fase sólida, selección mediada por anticuerpo, diferencias en la carga eléctrica; lechos inmunomagnéticos, separación celular activada por fluorescencia (FACS) u otros medios.

Después de la disgregación, la población de células activas puede lavarse/aclararse para eliminar aditivos y/o productos secundarios del proceso de disgregación (por ejemplo, colagenasa y lípido libre recién liberado). La población de células activas podría concentrarse por centrifugación. En una realización, las células se concentran y la colagenasa se elimina pasando la población celular a través de un sistema de membrana giratorio de flujo continuo o semejante, tal como, por ejemplo, el sistema descrito en la Pat. U.S. No. 5.034.135; y 5.234.608.

Además de lo anterior, existen muchos métodos post-lavado que pueden aplicarse para una purificación adicional de la población de células activas. Éstos incluyen tanto la selección positiva (seleccionar las células diana), como selección negativa (eliminación selectiva de las células no deseadas) o combinaciones de éstas. En otra realización, el sedimento celular podría resuspenderse, ponerse como una capa sobre (o debajo de) un material fluido formado en un gradiente de densidad continuo o discontinuo y ponerse en una centrífuga para la separación de poblaciones celulares tomando como base la densidad celular. En una realización similar, podrían usarse estrategias de flujo continuo tal como aféresis y elutriación (con o sin contra-corriente). La adherencia a plástico seguida de un periodo corto de expansión celular también se ha aplicado a poblaciones de células madre adultas derivadas de la médula ósea. Esta estrategia usa condiciones de cultivo para expandir preferentemente una población mientras que las demás poblaciones se mantienen (y de esta manera se reducen por dilución con el crecimiento de células seleccionadas) o pierden debido a la ausencia de las condiciones de crecimiento requeridas. Las células activas que se han concentrado, cultivado y/o expandido pueden incorporarse en las matrices descritas.

En una realización, las células madre se recogen, las células recogidas se ponen en contacto con un medio adipogénico durante un tiempo suficiente para inducir la diferenciación en adipocitos, y los adipocitos se cargan en una matriz biocompatible que se implanta. En realizaciones adicionales, al menos parte de las células madre pueden diferenciarse en adipocitos de manera que una mezcla de ambos tipos celulares está presente inicialmente y cambia en el tiempo a sustancialmente sólo adipocitos, estando presentes las células madre en cantidades de pequeñas a indetectables. El tejido adiposo se fabrica *in vivo* por las células madre o se prepara *ex vivo* por las células madre.

Los hidrogeles de fibroína de seda descritos en la presente especificación pueden usarse para el reemplazo de lentes oculares. Como se ha mencionado anteriormente en aplicaciones potenciales para el líquido de la cavidad vítrea, un hidrogel de seda firme con alta transparencia óptica se modificaría adicionalmente para convertirse en bio-inerte, potencialmente mediante una alta dosificación de RGD. En el uso de geles de fibroína de seda para un reemplazo de lentes, una concentración de seda de aproximadamente 6% (p/v) a aproximadamente 10% (p/v) sería lo más apropiado. Este material debería moldearse en una forma apropiada para cumplir los requerimientos de una lente apropiada. El contenido apropiado de RGD para esta formulación estaría en el orden de aproximadamente 0,0001 a aproximadamente 1 mol de RGD por mol de fibroína de seda en el material de gel o en el orden de aproximadamente 5 a aproximadamente 100 moles de RGD por mol de fibroína de seda en el gel. Un componente RGD pequeño o un componente RGD muy grande podrían ser ambos muy útiles para evitar la proliferación celular bien mediante la denegación de restos de unión o mediante el suministro de tantos como células de anclaje e impedir la capacidad de moverse y proliferar.

Los hidrogeles de fibroína de seda descritos en la presente especificación pueden usarse como una plataforma para la administración de fármacos. Por ejemplo, el hidrogel de seda puede formarse con un agente farmacéutico bien atrapado en o unido al gel e inyectarse, implantarse o administrarse oralmente en el cuerpo. Para la administración prolongada o sostenida de fármacos, el hidrogel de seda puede manipularse para ser altamente resistente a la bioresorción e hidrofóbico en determinadas condiciones (por ejemplo, con un contenido en lámina β muy alto) lo que evita el crecimiento hacia dentro celular/tisular. Esto, a su vez, da lugar a una bioresorción prolongada del gel y, por extensión, a una liberación prolongada del fármaco tal como, por ejemplo, liberación sostenida del fármaco o liberación prolongada del fármaco. La plataforma de hidrogel de fibroína de seda puede producirse como un gel o como un sólido. El fármaco farmacéuticamente activo puede ser, sin limitación, proteínas, péptidos, esteroides, antibióticos, vitaminas, azúcares simples, genes, células transfectadas o no transfectadas. Para controlar el perfil de liberación del fármaco, el fármaco

farmacéuticamente activo puede mezclarse en primer lugar con disoluciones de seda y formar entonces un hidrogel. Este hidrogel de seda puede molerse en partículas más pequeñas mezcladas con una fase de gel de seda adicional que actúa como un vehículo bien con o sin un componente inductor de la viscosidad, un tensioactivo y/o un fluido lubricante incluido como salino. El hidrogel de seda con terapéutico unido también puede entrecruzarse además para aumentar la estabilidad para prolongar el periodo de liberación. En una estrategia alternativa, el hidrogel de seda puede mezclarse con otros polímeros, por ejemplo, ácido hialurónico, para prolongar la liberación de determinados factores de crecimiento o citoquinas y para estabilizar la funcionalidad. Además, el hidrogel de fibroína de seda puede servir como el recubrimiento exterior para sistemas de administración de fármacos coaxiales.

Los aspectos de una plataforma de administración de fármacos que comprende los hidrogeles de fibroína de seda descritos en la presente especificación son plataformas de administración de fármacos con liberación sostenida. Tal y como se usa en la presente memoria, el término "liberación sostenida" se refiere a la liberación de un fármaco farmacéuticamente activo durante un periodo de aproximadamente siete días o más. En aspectos de esta realización, una plataforma de administración de fármacos que comprende el hidrogel de fibroína de seda libera un fármaco farmacéuticamente activo con cinéticas de liberación sustancialmente de primer orden durante un periodo, por ejemplo, de aproximadamente 7 días después de la administración, aproximadamente 15 días después de la administración, aproximadamente 30 días después de la administración, aproximadamente 45 días después de la administración, aproximadamente 60 días después de la administración, aproximadamente 75 días después de la administración o aproximadamente 90 días después de la administración. En otros aspectos de esta realización, una plataforma de administración de fármacos que comprende el hidrogel de fibroína de seda libera un fármaco farmacéuticamente activo con cinéticas de liberación sustancialmente de primer orden durante un periodo, por ejemplo, de al menos 7 días después de la administración, al menos 15 días después de la administración, al menos 30 días después de la administración, al menos 45 días después de la administración, al menos 60 días después de la administración, al menos 75 días después de la administración o al menos 90 días después de la administración.

Los aspectos de una plataforma de administración de fármacos que comprende los hidrogeles de fibroína de seda descritos en la presente especificación son plataformas de administración de fármacos con liberación prolongada. Tal y como se usa en la presente memoria, el término "liberación prolongada" se refiere a la liberación de un fármaco farmacéuticamente activo durante un periodo de tiempo de menos de aproximadamente siete días. En aspectos de esta realización, una plataforma de administración de fármacos que comprende el hidrogel de fibroína de seda libera un fármaco farmacéuticamente activo con cinéticas de liberación sustancialmente de primer orden durante un periodo, por ejemplo, de aproximadamente 1 día después de la administración, aproximadamente 2 días después de la administración, aproximadamente 3 días después de la administración, aproximadamente 4 días después de la administración, aproximadamente 5 días después de la administración o aproximadamente 6 días después de la administración. En otros aspectos de esta realización, una plataforma de administración de fármacos que comprende el hidrogel de fibroína de seda libera un fármaco farmacéuticamente activo con cinéticas de liberación sustancialmente de primer orden durante un periodo, por ejemplo, de como máximo 1 día después de la administración, como máximo 2 días después de la administración, como máximo 3 días después de la administración, como máximo 4 días después de la administración, como máximo 5 días después de la administración o como máximo 6 días después de la administración.

Los aspectos de una plataforma de administración de fármacos que comprende los hidrogeles de fibroína de seda descritos en la presente especificación son plataformas de administración de fármacos con liberación prolongada. Tal y como se usa en la presente memoria, el término "fármaco farmacéuticamente activo" se refiere a una sustancia usada en el diagnóstico, tratamiento o prevención de una enfermedad o como un componente de una medicación.

Los aspectos de una plataforma de administración de fármacos que comprende los hidrogeles de fibroína de seda descritos en la presente especificación pueden, o no pueden, comprender además un componente solubilizante. El uso de dicho componente solubilizante es ventajoso para proporcionar cualquier liberación relativamente rápida del fármaco farmacéuticamente activo en el cuerpo para eficacia terapéutica. Dicho componente solubilizante, por supuesto, deberá ser fisiológicamente aceptable. En una realización de la presente plataforma de administración de fármacos, una cantidad eficaz de un componente solubilizante se proporciona para solubilizar una cantidad menor, que es menor del 50%, por ejemplo en un intervalo de aproximadamente 1% o aproximadamente 5% a aproximadamente 10% o aproximadamente 20%, del fármaco farmacéuticamente activo. Por ejemplo, la inclusión de un componente ciclodextrina, tal como β -ciclodextrina, sulfo-butíler β -ciclodextrina (SBE), otras ciclodextrinas y semejantes y mezclas de éstas, a aproximadamente 0,5 a aproximadamente 5,0% (p/v) solubiliza aproximadamente 1% a aproximadamente 10% de la dosis inicial de un fármaco farmacéuticamente activo. Esta fracción presolubilizada proporciona una dosis de carga fácilmente biodisponible, evitando de esta manera cualquier tiempo de retraso en la eficacia terapéutica.

Los aspectos de una plataforma de administración de fármacos que comprende los hidrogeles de fibroína de seda descritos en la presente especificación pueden, o no pueden, comprender además un componente de liberación sostenida. Los componentes de liberación sostenida incluyen, sin limitación, polímeros (en la forma, por ejemplo, de geles y microsferas), tales como, por ejemplo, poli (D,L-láctido) o poli(D,L-láctido co-glicólido), en cantidades eficaces

para reducir las velocidades de difusión local y/o las velocidades de disolución de las partículas de corticosteroides. El resultado es un perfil de velocidad de eliminación más plano con una C_{max} menor y una ventana terapéutica más prolongada, prolongando de esta manera el tiempo entre las inyección requeridas para muchos pacientes. Puede emplearse cualquier componente de liberación adecuado, preferiblemente condicionalmente aceptable. El componente de liberación sostenida es preferiblemente biodegradable o bioabsorbible en el ojo de manera que no permanece ningún residuo a largo plazo. La cantidad del componente de liberación retardada incluida puede variar en un intervalo relativamente amplio dependiendo, por ejemplo, del componente de liberación sostenida específico que se está empleando, el perfil de liberación específico deseado y factores semejantes. Las cantidades típicas de los componentes de liberación retardada, si los hay, incluidos en las presentes composiciones están en un intervalo de aproximadamente 0,05% (p/v) a 0,1% (p/v) a aproximadamente 0,5% (p/v) o aproximadamente 1% (p/v) o más (peso del ingrediente en el volumen total de la composición) de la composición.

Los hidrogeles de fibroína de seda descritos en la presente especificación pueden usarse como un recubrimiento superficial para mejorar la funcionalidad de los dispositivos médicos. Por ejemplo, el hidrogel de seda puede formarse en la superficie de un hilo o malla de seda para mejorar la biocompatibilidad del dispositivo. El volumen del hidrogel de seda puede reemplazarse gradualmente por tejido que crece hacia el interior. Este recubrimiento superficial de hidrogel de seda puede contener agentes farmacéuticos tales como factores de crecimiento para ayudar a conseguir el resultado deseado. Por ejemplo, puede añadirse PDGF para mejorar la regeneración de ligamentos y tendones, puede añadirse TGF- β para mejorar la regeneración de los cartílagos y pueden añadirse antibióticos para curar o prevenir infecciones en el sitio del implante. El uso de fármacos tales como anestésicos locales, lidocaína, por ejemplo, conjuntamente con el gel de seda podría reducir el dolor causado por las inyecciones del material. El dispositivo puede moldearse y colarse o moldearse y remodelarse e implantarse entonces para la reconstrucción de tejidos. Además, el gel de fibroína de seda podría combinarse con células para propósitos de una reparación biológicamente potenciada.

El gel de seda podría emplearse como un recubrimiento en varias formas diferentes. Los dispositivos podrían sumergirse en disolución de seda y exponerse a acelerante en un molde de manera que el gel de seda se desarrollaría en una forma específica según el molde. En otra realización, el dispositivo podría sumergirse en disolución de seda y exponerse a un volumen de acelerante mediante un proceso de inmersión, dando lugar a una capa uniforme de gel de seda recubriendo el dispositivo. En otra realización, sería posible sumergir el dispositivo en acelerante e introducirlo en un volumen de disolución de seda, formando de nuevo una capa uniforme de gel de seda recubriendo el dispositivo. En otra realización, el dispositivo podría sumergirse en una mezcla de disolución de seda gelificante y acelerante. En otra realización, una mezcla gelificante de disolución de seda y acelerante podría añadirse al dispositivo en un molde. En otra realización más, los componentes de gel podrían moldearse separadamente en el dispositivo, por ejemplo, pulverizando o por medio de una espátula, y esta aplicación mezclaría los componentes, causando de esta manera la gelificación. En cualquiera de estos casos, podría añadirse un agente terapéutico como se ha descrito previamente. También podrían aplicarse aquí técnicas convencionales para modificar la textura de la superficie tal como la introducción y disolución de sales cristalinas.

La concentración de seda del recubrimiento se determinará tomando como base la necesidad proyectada para el dispositivo en sí mismo. En el caso de un recubrimiento duro, una concentración de fibroína de seda de aproximadamente 6% (p/v) a aproximadamente 10% (p/v) sería apropiada. En el caso de un recubrimiento blando, aproximadamente 2% (p/v) a aproximadamente 5% (p/v) sería apropiado. La concentración de RGD del recubrimiento se determinará tomando como base el comportamiento biológico deseado del dispositivo. Para la interacción y crecimiento hacia dentro tisular general, una concentración de RGD entre aproximadamente 0,1 y aproximadamente 3 moles de RGD por mol de seda sería apropiada. En casos en los que fuera deseable un perfil de crecimiento hacia dentro del huésped débil, el contenido apropiado de RGD estaría en el orden de aproximadamente 0,0001 a aproximadamente 0,01 moles de RGD por mol de seda en el material de gel o en el orden de aproximadamente 5 a aproximadamente 100 moles de RGD por mol de seda en el gel. Un componente RGD pequeño o un componente RGD muy grande podrían ser ambos muy útiles para evitar la proliferación celular bien mediante la denegación de restos de unión o mediante el suministro de tantos como células de anclaje e impedir la capacidad de moverse y proliferar.

En una realización, la presente invención proporciona una "cola" peptídica de cinco aminoácidos capaz de unir o conjugar una molécula X a una molécula o fibroína de seda cuando la molécula X está unida a la cola. Tal y como se usa en la presente memoria, el término "unir" o "conjugar" en el contexto de molécula X se refiere a una unión física indirecta de una molécula X a una fibroína de seda a través de una tercera entidad, siendo la "cola" peptídica de cinco aminoácidos esa entidad. En una realización, la cola se une a la fibroína de seda por interacción hidrofóbica con la fibroína de seda. Alternativamente, la "cola" une las moléculas de seda por enlace de hidrógeno y/o enlace covalente. Se prevé que la "cola" puede unir fibroínas de seda por una combinación de interacciones hidrofóbicas, enlaces de hidrógeno y enlaces covalentes. Mediante la unión de una molécula X a una "cola" descrita en la presente memoria, es posible unir indirectamente la molécula X a la fibroína de seda mediante la cola y así a los hidrogeles de seda descritos en la presente memoria. De acuerdo con esto, en una realización, la "cola" peptídica de cinco aminoácidos comprende residuos de aminoácidos hidrofóbicos y/o apolares (no polares) tales como valina, leucina, isoleucina, fenilalanina,

- 5 triptófano, metionina, cisteína, alanina, tirosina, serina, prolina, histidina, treonina y glicina. Son posibles varias combinaciones de residuos de aminoácidos hidrofóbicos y/o apolares, por ejemplo, LLLLL (SEQ ID NO: 15), LLFFL (SEQ ID NO: 16), LFLWL (SEQ ID NO: 17), FLWLL (SEQ ID NO: 18) y LALGL (SEQ ID NO: 19). En otras realizaciones, la cola comprende cualquier combinación de los veinte residuos de aminoácidos convencionales estándar. En otras realizaciones, la cola comprende residuos de aminoácidos hidrofóbicos y/o apolares (no polares) y con cadena laterales hidrofóbicas, por ejemplo, arginina y lisina. Tal y como se usa en la presente memoria, el término "que comprende" o "comprende" significa que también pueden estar presentes otros elementos además de los elementos definidos presentados. El uso de "que comprende" indica inclusión en lugar de limitación.
- 10 En una realización, la molécula X está unida a una cola en el extremo carboxilo (COOH) del péptido de cinco aminoácidos. En otra realización, la molécula X está unida a una cola en el extremo amino (NH₂) del péptido de cinco aminoácidos.
- En una realización, la "cola" peptídica de cinco aminoácidos capaz de unir o conjugar una molécula X a una molécula o fibroína de seda cuando la molécula X está unida a la cola comprende más de cinco residuos de aminoácidos, por ejemplo, seis o siete residuos de aminoácidos hidrofóbicos y/o apolares, tales como LLLLLL (SEQ ID NO: 20).
- 15 En una realización, la "cola" peptídica de cinco aminoácidos comprende residuos de aminoácidos que son parte hidrofóbicos (es decir, la parte de la cadena lateral más cercana a la cadena principal de la proteína), por ejemplo, arginina y lisina. En una realización, la parte de residuos de aminoácidos hidrofóbicos flanquean la "cola" peptídica de cinco aminoácidos tal como en RLLLLL (SEQ ID NO: 21), KLLLLL (SEQ ID NO: 22) y KLLLLL (SEQ ID NO: 23).
- 20 En una realización, la "cola" peptídica de cinco aminoácidos está separada de una molécula X por un péptido espaciador. Los péptidos espaciadores generalmente deben tener residuos de aminoácidos no polares, tales como, glicina y prolina. En una realización, el espaciador comprende residuos de aminoácidos no naturales tales como no aminoácidos y aminoácidos sustituidos con ceto. Dichos residuos de aminoácidos no naturales son muy conocidos para un experto en la técnica.
- 25 En una realización, el péptido espaciador está unido a una cola en el extremo carboxilo (COOH) del péptido de cinco aminoácidos. En otra realización, el espaciador está unido a una cola en el extremo amino (NH₂) del péptido de cinco aminoácidos.
- 30 La longitud del péptido espaciador es variable. El espaciador sirve para unir la molécula X y la cola entre sí y también para proporcionar libertad estérica a la molécula X, permitiendo una orientación apropiada de una molécula X (por ejemplo, dominios de unión a células tales como el dominio RGD) y la interacción correcta de la molécula X con células *in vivo*. Un espaciador que es demasiado corto puede evitar que la molécula X sea funcional apropiadamente (es decir, manteniéndola demasiado firme a las moléculas de seda y lejos de las células), un espaciador que es demasiado largo también puede causar efectos no deseados (es decir, asociación no específica de péptidos o eficacia disminuida del péptido debido a rotura del espaciador). En una realización, el número de residuos de aminoácidos en un espaciador puede variar de 1 a 300. En una realización, el espaciador comprende un único residuo de aminoácido, tal como una G o una P. Los ejemplos de espaciadores con más residuos de aminoácidos son GSPGISGGGGGILE (SEQ ID NO: 24) y SGGGGKSSAPI (SEQ ID NO: 25).
- 35 En una realización, la molécula X es cualquier molécula biológica o fragmento de ésta. Los ejemplos de moléculas biológicas incluyen, pero no están limitados a, factores de crecimiento, hormonas, citoquinas, quimioquinas, compuestos de la matriz extracelular, proteína osteogénica (OP), proteína morfogenética ósea (BMP), factor de crecimiento y diferenciación (GDF), factor de crecimiento transformante (TGF), factor de crecimiento epidérmico (EGF), factor de crecimiento del endotelio vascular (VEGF), interleuquina (IL), factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF), factor de crecimiento de fibroblastos (FGF), factor de crecimiento semejante a la insulina (IGF), factor de crecimiento de fibroblastos básico (BFGF), proteína de activación de fibroblastos (FAP), desintegrina, metaloproteínasa (ADAM), metaloproteínasa de la matriz (MMP), factor de crecimiento del tejido conectivo (CTGF), factor de crecimiento derivado del estroma (SDGF), factor de crecimiento de queratinocitos (KGF), factor de necrosis tumoral (TNF), interferón (IFN), eritropoyetina (EPO), factor de crecimiento de hepatocitos (HGF), trombopoyetina (TPO), factor estimulante de colonias de granulocitos (G-CSF), factor estimulante de colonias de granulocitos y macrófagos (GM-CSF), miostatina (GDF-8), colágeno, elastina, laminina, ácido hialurónico, decorina, actina y tubulina. Los fragmentos ejemplares de moléculas biológicas incluyen pero no están limitados a dominios de unión de integrina celular conocidos incluyendo pero no limitados a RGD, KQAGDV (SEQ ID NO: 4), PHSRN (SEQ ID NO: 5), YIGSR (SEQ ID NO: 6), CDPGYIGSR (SEQ ID NO: 7), IKVAV (SEQ ID NO: 8), RNIAEIIKDI (SEQ ID NO: 9), YFQRYLI (SEQ ID NO: 10), PDSGR (SEQ ID NO: 11), FHRRRIKA (SEQ ID NO: 12), PRRARV (SEQ ID NO: 13) y WQPPRARI (SEQ ID NO: 14).
- 40 En otras realizaciones, la molécula X es cualquier compuesto polimérico recombinante, sintético o no nativo. Los ejemplos incluyen pero no están limitados a quitina, ácido poli-láctico (PLA), ácido poli-glicólico (PGA), como trazadores (por ejemplo, radioisótopos), agentes de contraste (por ejemplo, agentes de tinción de formación de imágenes),
- 45
- 50
- 55

aptámeros, avímeros, péptidos, ácidos nucleicos, recubrimientos de polisacárido modificado, fármacos (fármacos de quimioterapia) y anticuerpos recombinantes o restos basados en anticuerpos.

En una realización, la presente invención proporciona una molécula sintética que tiene la fórmula: (molécula X)_n-(péptido espaciador)₀₋₃₀₀-(cola)-NH₂ para unión con molécula o fibroína de seda, en la que "n" es un número entero que varía de 1-30 y en la que los residuos de aminoácidos del espaciador varían de 0-300. Los ejemplos de dicha molécula sintética capaz de unirse a molécula o fibroína de seda son: GRGDIPASSKG₄SRL₆R-NH₂ (SEQ ID NO: 1), Ac-GdRGDIPASSKG₄SdRL₆dR-NH₂ (SEQ ID NO: 2), (VEGF)-(VEGF)-GSPGISGGGGGILEKLLLLL-NH₂ (SEQ ID NO: 26), (HIV-C-péptido)₃-GSPGISGGGGGILEKLALWLLR-NH₂ (SEQ ID NO: 27), (taxol)₂-GSPGISGGGGGILERLLLLR-NH₂ (SEQ ID NO: 28), y (EPO)₂-GSPGISGGGGGILERLLWLLR-NH₂ (SEQ ID NO: 29). Cuando se usa en el contexto del hidrogel de seda descrito en la presente memoria, la molécula sintética de SEQ ID NO. 1 permite una mejor unión a tejido de la construcción de hidrogel *in vivo*, la molécula sintética de SEQ ID NO: 26 puede estimular la generación de vasos sanguíneos (neo-angiogénesis) en construcciones obtenidas por ingeniería de tejidos, la molécula sintética de SEQ ID NO: 28 puede proporcionar una liberación lenta de medicación anti-VIH en la forma de un parche de administración transdérmica, la molécula sintética de SEQ ID NO: 28 puede proporcionar dosificación sostenida de fármacos anti-cancerosos *in vivo* y la molécula sintética de SEQ ID NO: 29 puede proporcionar una liberación lenta de EPO durante el tratamiento de quimioterapia del cáncer.

La invención engloba formulaciones de hidrogel de seda inyectables que comprenden una molécula sintética que tiene la fórmula: (molécula X)_n-(péptido espaciador)₀₋₃₀₀-(cola)-NH₂ o una molécula sintética que tiene la fórmula: (molécula X)_n-(péptido espaciador)₀₋₃₀₀-(cola)-NH₂ y un péptido anfílico. El péptido anfílico es 23RGD.

Básicamente, una molécula X es cualquier entidad, natural o sintética, que puede ser útil y puede usarse en el contexto de hidrogeles de seda.

En una realización, la invención proporciona un método para conjugar una molécula X a una molécula o fibroína de seda que comprende mezclar una molécula sintética que tiene la fórmula: (molécula X)_n-(péptido espaciador)₀₋₃₀₀-(cola)-NH₂ con una molécula o fibroína de seda o disolución de seda.

Los métodos de síntesis peptídica son conocidos para un experto en la técnica, por ejemplo, los péptidos descritos en la presente memoria pueden construirse sintéticamente por técnicas de polimerización de péptidos adecuadas conocidas, tal como técnicas exclusivamente de fase sólida, técnicas de fase sólida parcial, condensación de fragmentos o acoplamiento en disolución clásicos. Por ejemplo, los péptidos de la invención pueden sintetizarse por el método de fase sólida usando métodos estándar basados en grupos protectores bien t-butiloxycarbonilo (BOC) ó 9-fluorenilmetoxicarbonilo (Fmoc). Esta metodología se describe por G.B. Fields et al. en *Synthetic Peptides: A User's Guide*, W.M. Freeman & Company, Nueva York, N.Y., p. 77-183 (1992) y en el libro de texto "Solid-Phase Synthesis", Stewart & Young, Freeman & Company, San Francisco, 1969 y se ejemplifican por la descripción de la Pat. U.S. No. 4.105.603, presentada el 8 de agosto, 1979. La síntesis en disolución clásica se describe con detalle en "Methoden der Organischen Chemie (Houben-Weyl): Synthese von Peptiden", E. Wunsch (editor) (1974) Georg Thieme Verlag, Stuttgart Alemania Occidental. El método de síntesis de condensación de fragmentos se ejemplifica en la Pat. U.S. No. 3.972.859. Otras síntesis disponibles se ejemplifican en la Pat. U.S. No. 3.842.067, Pat. U.S. No. 3.872.925, presentada el 28 de enero, 1975, Merrifield B, *Protein Science* (1996), 5: 1947-1951; The chemical synthesis of proteins; Mutter M, *Int J Pept Protein Res* 1979 Mar; 13(3): 274-7 Studies on the coupling rates in liquid-phase peptide synthesis using competition experiments; y Solid Phase Peptide Synthesis en la serie *Methods in Enzymology* (Fields, G.B. (1997) Solid-Phase Peptide Synthesis, Academic Press, San Diego. #9830). También pueden usarse métodos de ADN moleculares. La secuencia codificadora del espaciador corto puede construirse hibridando una pareja complementaria de cebadores. Un experto en la técnica puede diseñar y sintetizar oligonucleótidos que codificarán el espaciador seleccionado.

Los métodos para unir péptidos también son conocidos en la técnica. La unión física de los péptidos aislados individuales en péptidos oligoméricos como se muestra en la presente memoria, puede efectuarse por procedimientos de conjugación química muy conocidos en la técnica, tal como creando uniones peptídicas, uso de agentes de condensación y empleando reactivos de entrecruzamiento bifuncionales muy conocidos. La conjugación puede ser directa que incluye uniones que no implican ningún grupo intermedio, por ejemplo, uniones peptídicas directas, o indirecta, en la que la unión contiene un resto intermedio, tal como una proteína o péptido, por ejemplo, albúmina plasmática, u otra molécula espaciadora. Por ejemplo, la unión puede hacerse mediante un agente de entrecruzamiento heterobifuncional u homobifuncional, por ejemplo, carbodiimida, glutaraldehído, 3-(2-piridilil) propionato de N-succinimidilo (SPDP) y derivados, bis-maleimida, ciclohexano-1-carboxilato de 4-(N-maleimidometilo) y semejantes.

El entrecruzamiento también puede conseguirse sin agentes de entrecruzamiento exógenos utilizando grupos reactivos en las moléculas que se están conjugando. Los métodos para entrecruzar químicamente moléculas de péptidos son conocidos generalmente en la técnica y varios agentes hetero y homobifuncionales se describen, por ejemplo, en Pat. U.S. Nos. 4.355.023, 4.657.853, 4.676.980, 4.925.921 y 4.970.156 e *Immuno Technology Catalogue and Handbook*,

Pierce Chemical Co. (1989). Dicha conjugación, incluyendo entrecruzamiento, debe realizarse de manera que no afecte sustancialmente la función deseada del oligómero peptídico o entidad conjugada a ésta, incluyendo agentes terapéuticos y restos capaces de unir sustancias de interés.

5 La conjugación de péptidos individuales puede efectuarse por una unión a través del extremo N-terminal o C-terminal del péptido, lo que resulta en un oligómero peptídico unido en N o un oligómero peptídico unido en C, respectivamente.

10 Será evidente para un experto en la técnica que pueden usarse conectores alternativos para unir péptidos, por ejemplo, el uso de agentes de entrecruzamiento proteicos químicos. Por ejemplo, agente de entrecruzamiento homobifuncional tal como disuccinimidil-suberimidato-dihidrocloruro; dimetil-adipimidato-dihidrocloruro; 1,5-2,4-dinitrobenzoceno o agentes de entrecruzamiento heterobifuncionales tales como N-hidroxisuccinimidil 2,3-dibromopropionato; 1-etil-3-[3-dimetilaminopropil] carbodiimida hidroclicloruro; y succinimidil4-[n-maleimidometil]-ciclohexano-1-carboxilato.

Ahora se describirán adicionalmente varias realizaciones mediante ejemplos no limitativos.

Ejemplos

15 Los ejemplos siguientes ilustran realizaciones representativas contempladas ahora, pero no debe considerarse que limitan la fibroína de seda purificada descrita ni el método para purificar dichas fibroína de seda, hidrogeles que comprenden dicha fibroína de seda con o sin un péptido anfílico y métodos para preparar hidrogeles que comprenden dicha fibroína de seda y el uso de hidrogeles de fibroína de seda en una variedad de usos médicos, incluyendo, sin limitación rellenos para espacio tisular, moldes para la reconstrucción o regeneración tisular, soportes para células en aplicaciones de ingeniería tisular y para modelos de enfermedad, un recubrimiento superficial para mejorar la función de los dispositivos médicos o como una plataforma para la administración de fármacos.

20 Ejemplo 1

Extracción de Sericina de Seda

25 La fibroína de seda para la generación del hidrogel se obtuvo en la forma de seda desgomada de *B. mori* con un tamaño de 20denier-22denier ($38 \mu\text{m} \pm 5,6 \mu\text{m}$ de diámetro). Esta seda desgomada se procesó adicionalmente con el fin de eliminar la goma proteica presente inherentemente y potencialmente antigénica, sericina, que une entre sí filamentos de fibroína independientes. Esto se hizo como se ha descrito previamente en la presente memoria. Después de la eliminación de la sericina, la fibroína pura se secó cuidadosamente hasta niveles de humedad ambiente usando una campana de flujo laminar.

Ejemplo 2

Generación de Disolución de Fibroína de Seda

30 Los filamentos de fibroína de seda, limpiados de su sericina y lavados para eliminar restos insolubles y contaminantes iónicos, se usaron para la generación de una disolución acuosa de seda. Estas fibras de seda se añadieron a una disolución de 9,3M LiBr y agua purificada (por ejemplo, MILLI-Q[®] Ultrapure Water Purification Systems) (Millipore, Billerica, MA) para preparar una disolución que consiste en seda pura al 20% (% p/v). Esta mezcla se calentó hasta una temperatura de 60°C y se digirió durante un periodo de cuatro horas. Un total de 12 mL de la disolución resultante se cargó en un casete de diálisis de 3 mL-12 mL Slide-A-Lyzer (Pierce Biotechnology, Inc., Rockford, IL) (punto de corte de peso molecular de 3,5 kD) y se puso en un vaso de precipitados que contiene agua purificada como un tampón de diálisis a un volumen de 1 L de agua por 12 mL de casete de disolución de seda. Los vasos de precipitados se pusieron en placas de agitación y se agitaron continuamente durante la duración de la diálisis. Los cambios del tampón de diálisis ocurrieron a 1, 4, 12, 24 y 36 horas del tiempo de procesamiento.

40 Después de la diálisis, la disolución se quitó de los casetes mediante una jeringa y aguja y se centrifugó a 30.000 g de fuerza centrífuga relativa (RCF) a 4°C durante 30 minutos, se decantó el sobrenadante (disolución de seda) en un tubo de centrifuga limpio y se repitió la centrifugación durante 30 minutos adicionales. Este proceso de centrifugación es beneficioso para la eliminación de restos de partículas insolubles asociados con la disolución de seda tanto antes de como después de la diálisis. Se cree que dichos restos insolubles podrían funcionar como antígenos *in vivo* o quizá puntos de nucleación alrededor de los cuales podría producirse la gelificación de la seda, acortando la vida de almacenamiento a temperatura ambiente de la disolución y comprometiendo la uniformidad del sistema de gelificación. Después de la finalización de la segunda centrifugación, el sobrenadante se recogió de nuevo y se almacenó a 4°C hasta que se necesitó. Para confirmar la uniformidad del producto de la diálisis, se recogieron volúmenes conocidos de la disolución, se calculó su masa y se secaron completamente mediante liofilización. Se calculó la masa de estas muestras liofilizadas y la masa seca de disolución se comparó con el volumen de disolución inicial para determinar el porcentaje de seda presente por unidad de volumen de disolución. Además, la disolución se evaluó por análisis de

Espectroscopía Fotoelectrónica de Rayos X (XPS) para asegurar que no estaban presentes cantidades detectables de iones Li^+ o Br^- en la disolución.

Ejemplo 3

Inducción de la Gelificación

5 Se empleó una variedad de métodos diferentes en el curso del desarrollo del hidrogel para los propósitos de contrastar y comparar determinadas propiedades relevantes de varias fórmulas. Independientemente de la naturaleza en la que se realizó el proceso de gelificación, la determinación final de que un estado de "gel" se había alcanzado se aplicó uniformemente a todos los grupos. Una disolución o mezcla de disoluciones (es decir, disolución de seda mezclada con un potenciador o disolución potenciadora) se consideró un gel después de observar la formación de una fase sólida
10 uniforme a lo largo del volumen total, con una apariencia generalmente opaca y blanca.

Las muestras que se quieren producir por gelificación pasiva, no se expusieron a ningún aditivo potenciador. Estos geles se produjeron midiendo un volumen de disolución de seda en un recipiente de moldeado, para los propósitos de estos experimentos, tubos de polipropileno sellados frente a la penetración de aire y la pérdida de agua, y se dejó que la muestra permaneciera en condiciones ambientales (nominalmente 20-24°C, 1 atm, 40% de humedad relativa) hasta que
15 estuvo totalmente gelificada. Se tuvo cuidado de asegurar la uniformidad del material de construcción de los recipientes de moldeado a lo largo de los grupos para evitar la influencia potencial de efectos de superficie. Estos efectos pueden funcionar para potenciar o inhibir la gelificación y pueden estar causados por factores que incluyen pero no están limitados a siliconización, rugosidad superficial, carga superficial, contaminación con restos, hidrofobicidad/hidrofilicidad superficial y dinámicas de transferencia de masa alteradas.

20 Las muestras producidas mediante un proceso inducido por 23RGD se prepararon de una de dos maneras, siendo la primera la adición directa de 23RGD en una proporción pre-determinada a la disolución de seda sin ninguna clase de reconstitución. El 23RGD (obtenido como una forma de polvo fino desecado) se mezcló en un volumen medido de disolución de seda al 8% en el recipiente de moldeado mediante pipeteo usando una pipeta de 1.000 μL . Estos geles se moldearon en tubos de polipropileno, se sellaron frente a penetración de aire y pérdida de agua, y se dejó que la muestra permaneciera en condiciones ambientales (nominalmente 20-24°C, 1 atm, 40% de humedad relativa) hasta que estuvo
25 totalmente gelificada.

Los geles inducidos por 23RGD también se produjeron disolviendo en primer lugar el polvo de 23RGD en agua purificada. La concentración de esta disolución se determinó tomando como base la cantidad de 23RGD que se iba a introducir en un gel y la concentración final de seda deseada en el gel. En el caso de geles de seda al 4% potenciados
30 con 23RGD, se usaron cantidades de agua iguales a la cantidad de disolución de seda al 8% que se va a usar en el gel para la disolución de cantidades apropiadas de 23RGD. En el caso de geles inducidos por la adición de 23RGD para generarse a una proporción molar de 3:1 23RGD:seda, se disolvió una cantidad de 23RGD en 1 mL de agua por 1 mL de disolución de seda al 8% que se quiere gelificar. Este mezclado también se realizó en el recipiente de moldeado, consiguiéndose mediante el pipeteo rápido con una pipeta de 1.000 μL cuando fue apropiado. Estos geles se moldearon
35 en tubos de polipropileno, sellados frente a la penetración de aire y la pérdida de agua, y se dejó que la muestra permaneciera en condiciones ambientales (nominalmente 20-24°C, 1 atm, 40% de humedad relativa) hasta que estuvo totalmente gelificada.

Las muestras producidas mediante la gelificación potenciada con etanol (EEG) se generaron mediante la adición directa de etanol a un volumen medido de disolución de seda al 8% en el recipiente de moldeado. El etanol se añade en una cantidad tal que el volumen añadido debe rendir una dilución volumétrica de la disolución de seda al 8% que resulta en la concentración final requerida de seda en el gel, asumiendo una pérdida mínima de volumen debida a la miscibilidad del orgánico añadido. La mezcla de etanol y disolución de seda se mezcla mediante pipeteo con una pipeta de 1.000 μL cuando fue apropiado. Estos geles se moldearon en tubos de polipropileno, sellados frente a la penetración de aire y la pérdida de agua, y se dejó que la muestra permaneciera en condiciones ambientales (nominalmente 20-24°C, 1 atm,
45 40% de humedad relativa) hasta que estuvo totalmente gelificada.

Las muestras producidas por un efecto combinado 23RGD-etanol (RGDEEG) se generaron usando una disolución de etanol al 90%, agua purificada al 10% y cantidades apropiadas de 23RGD disueltas en este disolvente. No fue posible disolver fácilmente el 23RGD en etanol puro y se creyó que el 23RGD no disuelto podría causar una baja distribución del péptido a lo largo de la fase de gel. Como resultado, se determinó que como una disolución de etanol y agua ofrece características de aceleración de la gelificación similares a una disolución de etanol puro y solubilidad razonable de 23RGD sería una alternativa aceptable. Una disolución de etanol al 90% y agua al 10% cumple estos dos criterios y por lo tanto se usó para la generación de estos geles. La concentración de 23RGD de esta disolución de etanol se determinó tomando como base la cantidad de 23RGD que se iba a introducir en un gel y la concentración final de seda deseada en le gel. En el caso de geles de seda al 4% potenciados con 23RGD, se usaron cantidades de etanol al 90% iguales a la
50

cantidad de disolución de seda al 8% que se iba a usar en el gel para la disolución de cantidades apropiadas de 23RGD. En el caso de geles inducidos por la adición de 23RGD para generarse a una proporción molar de 3:1 23RGD:seda, se disolvió una cantidad de 23RGD en 1 mL de etanol al 90% por 1 mL de disolución de seda al 8% que se quiere gelificar. Este mezclado también se realizó en el recipiente de moldeado, consiguiéndose mediante el pipeteo rápido con una pipeta de 1.000 μ L cuando fue apropiado. Estos geles se moldearon en tubos de polipropileno, sellados frente a la penetración de aire y la pérdida de agua, y se dejó que la muestra permaneciera en condiciones ambientales (nominalmente 20-24°C, 1 atm, 40% de humedad relativa) hasta que estuvo totalmente gelificada.

Los tiempos de gelificación de la seda se determinaron moldeando los geles según los métodos anteriores, siendo la excepción que los geles no se mezclaron por pipeteo, sino mediante agitación mecánica vigorosa. Estos estudios se realizaron usando tubos de microcentrífuga de 1,5 mL como recipientes de moldeado con grupos de muestra de N= 6 usados para cada formulación de gel (Figura 1). La determinación de que un estado de "gel" se había alcanzado se hizo en el método como se ha descrito anteriormente, tomando como base la observación de una fase sólida uniforme a lo largo del volumen total, con una apariencia generalmente opaca y blanca.

El tiempo de gelificación varió ampliamente dependiendo de la formulación específica. Las muestras de seda 8P tardaron 21 días hasta la gelificación mientras que las muestras 4P requirieron 31 ± 1 día (datos no mostrados). Las muestras EEG gelificaron significativamente más rápido que las muestras PG requiriendo una muestra 4E $27 \pm 5,4$ segundos para la gelificación ($p \leq 0,05$). Las muestras EEG gelificaron más rápidamente al incrementarse la concentración de etanol añadida con tiempos de gelificación requeridos de 1.770 ± 600 s, $670,3 \pm 101,0$ s, $29,8 \pm 5,2$ s, $9,7 \pm 2,0$ s y $4,2 \pm 0,8$ s para 6.4E, 6E, 4.8E, 4E y 3.2E respectivamente. Hubo diferencias significativas entre todos los tiempos excepto 4.8E y 4E, 4E y 3.2E y 4.8E y 3.2E. Los geles RGDEEG generaron un precipitado fibroso blanco firmemente localizado instantáneamente después de la adición de la disolución de etanol a la seda y gelificaron más rápidamente que las muestras PG, aunque fueron más lentos que los geles EEG. Las muestras 4RL, 4RM y 4RH tardaron $22,7 \pm 2,5$ segundos, $38,8 \pm 4,5$ segundos y $154,5 \pm 5$ segundos en gelificar diferenciándose 4RH significativamente de las demás formulaciones RGDEEG.

Los experimentos del tiempo de gelificación revelaron las restricciones en el tiempo planteadas por el método PG. Los resultados indicaron que, aunque una concentración de seda incrementada disminuyó el tiempo de gelificación, el tiempo total para gelificar disminuyó sólo de 31 días para 4P a 21 días para 8P. Esto puede resultar de la frecuencia incrementada de colisiones entre las moléculas de seda en disolución y el ensamblaje de red de gel resultante. Usando etanol añadido directamente a la disolución de seda como un acelerante, se demostró que disminuía dramáticamente el tiempo de gelificación de la seda por incremento del volumen de etanol añadido de una manera bien modelada por una función potencial. Esta gelificación rápida creciente está causada probablemente por una mayor competición para hidratar las moléculas de agua entre la seda y el etanol acoplado con la electronegatividad alterada de la disolución, favoreciendo ambos la agregación forzada de las moléculas de seda. Los estudios realizados en muestras RGDEEG revelaron que la adición de concentraciones mayores de RGD daban lugar a tiempos de gelificación incrementados modelados por una función exponencial. Esto parece contraintuitivo ya que se esperaba que RGD debería funcionar en cierta medida para acelerar la gelificación.

El retraso de la gelificación en las muestras RGDEEG puede resultar de dificultades en la unión molecular de la seda a los precipitados de seda recubiertos con RGD, quizá debido a la interferencia estérica con regiones hidrofóbicas de las cadenas de seda. Después de la adición del acelerante RGD-etanol a la disolución de seda, una gran cantidad de complejos seda-RGD precipitó de la disolución. Se observó durante la gelificación de las muestras RGDEEG que se formaba consistentemente un precipitado fibrilar, blanco, opaco en la mezcla de la disolución inmediatamente después del mezclado. Esta precipitación de la disolución puede ser la evidencia de este ensamblaje rápido de precipitados de alta concentración seda-RGD. Esta formación puede estar causada por la asociación entre micelas de seda y moléculas de péptido en disolución, interrupción de las micelas de seda y ensamblaje rápido de éstas en una estructura fibrilar firmemente localizada. Este ensamblaje rápido puede progresar hasta que los gradientes directores generados por las diferentes químicas del disolvente proporcionado por el etanol y el agua alcancen un estado de equilibrio. En este punto, las moléculas de seda son capaces de permanecer establemente en disolución ocurriendo un ensamblaje de red de seda adicional sólo por el alargamiento lento de los precipitados formados inicialmente. Aunque esta precipitación proporcionó un alto número de puntos de nucleación para iniciar la realización de una red de gel, estos puntos de nucleación pueden tener una utilidad limitada tomando como base la disponibilidad de los sitios de unión. Como resultado, las moléculas de seda restantes se ensamblaron mucho más lentamente. Estos precipitados también tendían a iniciar el ensamblaje de una red periférica comprendida en gran medida por restos de α -hélice y espiral al azar laxos, debido posiblemente a interferencia en el empaquetamiento de la seda debido a la interferencia de estas partículas.

Los hidrogeles producidos por los métodos descritos anteriormente obtienen un beneficio sustancial de la capacidad para controlar más precisamente el curso de tiempo para su gelificación en comparación con el de un gel convencionalmente diseñado y moldeado. Es evidente a partir de la monitorización del tiempo entre el moldeado y la

gelificación del dispositivo y geles moldeados similarmente, no potenciados o modificados exclusivamente con etanol que 23RGD en determinadas circunstancias puede manipularse para tener un efecto acelerante adicional después del proceso de gelificación. Este efecto potenciador observado mitiga tanto las restricciones de tiempo como la controlabilidad asociada con geles no modificados y altera adicionalmente la manera en la que se forma la red de agregados de proteína respecto a geles potenciados sólo con etanol.

5

Ejemplo 4

Determinación de Etanol Residual por Análisis Colorimétrico

Después de la gelificación de una muestra producida con un componente de etanol o 23RGD, el gel se quitó del recipiente de moldeado y se sumergió en un volumen de agua purificada como un tampón de lavado. Este volumen comprendía un volumen tal que la proporción volumétrica de agua a gel era $\geq 100:1$. Se dejó que el gel permaneciera estático en el tampón de lavado durante un periodo de 72 horas, cambiando el agua cada 12 horas.

10

Las muestras de gel de seda se evaluaron para determinar el contenido residual total de etanol en una serie de geles potenciados con 23RGD-etanol y etanol. Brevemente, las muestras de gel (N= 4 de cada tipo) generadas como se ha descrito anteriormente se procesaron y analizaron usando un Kit de Ensayo de Etanol (kit # K620-100 de BioVision Research Prods, Mountain View, CA). Las muestras de gel se cortaron hasta un tamaño de aproximadamente 0,3 cm de altura por 0,5 cm de diámetro (aproximadamente 250 mg). Se calculó la masa de estas muestras con una precisión de 0,1 mg usando una balanza APX-60 (Denver Instrument, Denver CO) según las instrucciones del fabricante. Estas muestras de gel se molieron individualmente usando una espátula de metal y se pusieron en 250 μ L de agua Milli-Q en tubos de microcentrifuga. Estos geles se incubaron a 37°C durante un periodo de 24 horas. Después de la incubación, los geles se centrifugaron en una microcentrifuga Eppendorf 5415 con un rotor HA 45-18-11 (Hamburgo, Alemania) a 18.000 rpm durante 30 minutos. Al término de esta etapa de centrifugación, el sobrenadante se usó como la muestra de interés según las instrucciones proporcionadas por el fabricante del kit. Se realizaron análisis colorimétricos de la muestra a una absorbancia de 570 nm usando un espectrofotómetro y, conjuntamente con una curva estándar, se calcularon los porcentajes residuales de etanol en el gel (Tabla 1, Figura 2). Se mostró en este proceso que la etapa de filtración es capaz de eliminar sustancialmente el etanol residual de los geles de seda, ya que ninguno de estos materiales presentó un componente de etanol residual de más del 5% de etanol en masa.

15

20

25

Tabla 1. Determinación de Etanol Residual por Análisis Colorimétrico					
Concentración de Seda	Disolvente Potenciador	Solutos Potenciador	Concentración Inicial de Etanol	Concentración Final de Etanol	
				Media	Devest
2%	90%	Ninguno	68%	2,49%	0,06%
		3:1 23RGD:Seda		4,44%	0,13%
		10:1 23RGD:Seda		4,77%	0,29%
4%		Ninguno	45%	2,55%	0,07%
		3:1 23RGD:Seda		2,86%	0,08%
		10:1 23RGD:Seda		2,97%	0,07%
6%		Ninguno	22,5%	3,12%	0,05%
		3:1 23RGD:Seda		3,16%	0,04%
		10:1 23RGD:Seda		2,99%	0,10%

Ejemplo 5

Cuantificación de 23RGD por HPLC

Los geles infundidos con 23RGD se estudiaron para cuantificar la cantidad de 23RGD unida al dispositivo de hidrogel de seda así como la cantidad de 23RGD libre que podría eliminarse por lavado del dispositivo en condiciones relevantes. Brevemente, muestras de gel infundido con 23RGD se moldearon y lavaron según los métodos anteriores, recogiendo las muestras de tampón de lavado de cada lavado para análisis posterior por HPLC. Además, posteriormente al último lavado, las muestras de gel se pulverizaron mecánicamente mediante una varilla de agitación de acero inoxidable y el

30

23RGD adsorbido se eliminó por incubación durante 4 horas en un tampón de disolución. Esta mezcla de gel y disolvente se centrifugó en un Eppendorf 5415C a 16.000 g RCF durante 30 minutos. El sobrenadante se recogió y se centrifugó otros 30 minutos a 16.000 g RCF y después de este tiempo el sobrenadante se recogió en un vial de muestra para análisis por HPLC. Las muestras del tampón de lavado del primer y último lavado se centrifugaron de la misma manera después de diluirlas con el mismo disolvente el gel se extrajo con una proporción volumétrica de 1 parte de tampón de lavado a 4 partes de disolvente. Para asegurar que área superficial expuesta al lavado del dispositivo de gel 23RGD no era un factor limitante, se realizó el mismo proceso de lavado y extracción en dispositivos pulverizados después de la gelificación y antes del lavado. El área del pico consistente con 23RGD para cada muestra de HPLC se tomó y estos datos se compararon frente a una curva estándar generada para 23RGD en la misma unidad de HPLC bajo condiciones de manejo y corrida idénticas.

Los datos resultantes indicaron que los niveles de señal de 23RGD en muestras recogidas del tampón de lavado eran sólo ligeramente mayores que los valores para disolvente 23RGD solo y no eran mensurables por la curva estándar, que se esperaba que resolviera una proporción relativa 23RGD:seda de 0,05:1. En comparación el ensayo fue capaz de detectar una proporción de 3,35:1 en el gel potenciado con 23RGD final lavado y extraído.

Los datos de HPLC confirmaron la retención completa de RGD en el material de hidrogel de seda después del proceso de lavado. Esto proporciona no sólo un componente RGD funcional para esta serie específica de formulaciones de hidrogel, sino una indicación para uso de péptidos anfílicos como candidatos para la introducción de otros componentes en geles de seda. Este conocimiento podría aplicarse a varias otras secuencias peptídicas biológicamente activas, aunque deben realizarse trabajos adicionales para entender cómo estos péptidos específicos podrían influir en la gelificación y cómo la gelificación, a su vez, influye en la funcionalidad de estos péptidos.

Ejemplo 6

Cálculo de Masa Seca del Gel de Seda

Las muestras de gel de seda de varias formulaciones potenciadas con 23RGD-etanol y etanol se cortaron en cilindros de muestra (N= 4 de cada tipo) de aproximadamente 0,7 cm de altura por 0,5 cm de diámetro (aproximadamente 500 mg). Se calculó la masa de estas muestras con una precisión de 0,1 mg usando una balanza APX-60 (Denver Instrument, Denver CO) según las instrucciones del fabricante y se pusieron en tubos de microcentrífuga con masa calculada. Después de esto, las muestras se congelaron hasta -80°C durante 24 horas. Al final de este tiempo, las muestras se pusieron en una unidad liofilizadora durante un periodo de 96 horas para eliminar todo el contenido de agua. Después de la finalización de este secado de 96 horas, se calculó de nuevo la masa de los componentes proteicos remanentes de las muestras de gel de seda y se determinó la fracción de masa de agua en las muestras.

El cálculo de masa seca del gel mostró un porcentaje creciente de masa seca al incrementar el componente RGD en cada grupo de concentración de seda (Figura 3). La masa seca de 2E fue significativamente menor que 2RL y 2RM ($p \leq 0,05$) a $1,63 \pm 0,30\%$, $3,85 \pm 1,23\%$ y $4,03 \pm 0,53\%$ respectivamente (Figura 3A). Las masas secas de 4E, 4RL y 4RM se diferenciaron todas significativamente entre sí a $4,05 \pm 0,10\%$, $4,56 \pm 0,12\%$ y $5,19 \pm 0,18\%$ respectivamente (Figura 3B). La masa seca de 6E fue significativamente menor tanto de 6RL como 6RM a $5,84 \pm 0,15\%$, $6,53 \pm 0,28\%$ y $6,95 \pm 0,40\%$ respectivamente (Figura 3C).

Los geles, independientemente de la concentración de seda, mostraron una tendencia significativamente estadística hacia un porcentaje decreciente de masa de agua en cada material de gel al incrementarse el componente 23RGD según se determina por análisis de cada grupo de concentración de seda con ANOVA (Figura 4, Tukey post hoc, $p < 0,05$). Este fenómeno podría explicarse por la posibilidad de que 23RGD cause la formación de una estructura secundaria diferente en los hidrogeles de seda y que esta estructura podría ser menos hidrofílica que el material no potenciado con 23RGD. Es posible que esto pueda manifestarse en una proporción diferente de estructura de lámina β , estructura de hélice α y espiral al azar no ordenado para los materiales tratados con 23RGD que sus equivalentes, tendiendo a favorecer la conformación más hidrofóbica de lámina β .

Los datos de masa seca del gel de seda revelaron que concentraciones crecientes tanto de seda como de RGD en los geles de seda incrementaban el porcentaje de masa seca en estos materiales, aunque el incremento de RGD fue demasiado grande para atribuirlo sólo a masa de péptido adicional. Este fenómeno podría explicarse por la estructura postulada de los geles RGDEEG mencionada previamente respecto a los geles PG y EEG. Es probable que las regiones grandes de estructura de lámina β poco asociadas en los geles RGDEEG no funcionen bien para integrar agua en la estructura. Las regiones de inter-conexión de las estructuras de hélice α y espiral al azar no ordenado son capaces de atrapar el agua, pero lo hacen con menos éxito que en el caso de los geles más homogéneos EEG. También puede ser posible que la secuencia RGD hidrofílica interfiriera con el procedimiento de cálculo de masa seca, causando una ganancia rápida de masa de agua después de la exposición de las muestras a condiciones atmosféricas.

Ejemplo 7

Bioresorción Enzimática

Los geles especificados se sometieron a digestión *in vitro* por una disolución que consistió en una mezcla de proteasas no específicas. Brevemente, las muestras de gel se moldearon para generar muestras uniformes, cilíndricas de aproximadamente 1 gramo de peso total (aproximadamente 1 mL de gel). Estas muestras se digirieron con una proteasa obtenida de la bacteria *Streptomyces griseus* (Sigma catálogo No. P-5147) suspendida en salino tamponado con fosfato a una concentración de 1 mg/mL. Se usó una proporción de 3 mL de disolución de proteasa por 1 mL de gel inicial para los propósitos de este estudio. La disolución de proteasa se añadió a un tubo sellado que contenía el gel y se incubó durante 24 horas a 37°C sin mezclado mecánico. Después de 24 horas, la disolución se drenó a través de una pieza de tela de alambre tejido de acero inoxidable 316. Esto permitió la retención de todas las partículas de gel con un diámetro mayor de 50 µm (el tamaño del hueco era 43 µm por 43 µm), se consideró que las menores a éstas se habían "bioresorbido" para los propósitos de este ensayo. Después de un drenaje concienzudo de la disolución, la masa del gel se midió húmeda, pero desprovista de humedad atrapada en exceso. La disolución de proteasa se reemplazó y la muestra se incubó 24 horas adicionales a 37°C. Este proceso se repitió hasta que las muestras se bioresorbieron durante un total de cuatro días, cambiando las disoluciones y calculando la masa cada día.

Las muestras PG y las muestras EEG se bioresorbieron de manera similar, diferenciándose significativamente sólo a D4 donde las muestras 4P retuvieron $62,89 \pm 4,26\%$ de la masa original y las muestras 4E retuvieron $53,27 \pm 5,45\%$ ($p \leq 0,05$) (Figura 5A). Los geles 6E incubados en PBS no mostraron una pérdida significativa de masa durante el curso de la incubación de 4 días (Figura 5B). Los geles de seda EEG con altas concentraciones de fibroína presentaron una retención de masa mayor que las concentraciones más bajas en todos los días. En el Día 1, hubo diferencias significativas entre 2E y todos los demás tipos de geles con los geles 2E, 4E y 6E reteniendo $57,04 \pm 10,03\%$, $93,21 \pm 9,47\%$ y $103,98 \pm 3,65\%$, respectivamente mientras que 6E en PBS retuvo $101,18 \pm 12,01\%$. En el Día 2, hubo de nuevo diferencias significativas entre 2E y todos los demás tipos de geles con los geles 2E, 4E y 6E reteniendo $36,59 \pm 7,07\%$, $90,60 \pm 9,24\%$ y $103,24 \pm 6,38\%$ de la masa original mientras que 6E en PBS retuvo $98,28\% \pm 12,38\%$. En el Día 3, hubo diferencias significativas entre todos los tipos de geles en proteasa, con los geles 2E, 4E y 6E reteniendo $32,36 \pm 10,48\%$, $67,85 \pm 8,82\%$ y $95,51 \pm 8,97\%$ de la masa original. Las muestras 6E incubadas en PBS no se diferenciaron de las incubadas en proteasa, reteniendo $100,39\% \pm 12,73\%$ de la masa original. En el Día 4, hubo diferencias significativas entre todos los tipos de geles, con los geles 2E, 4E y 6E reteniendo $28,14 \pm 4,75\%$, $53,27 \pm 5,45\%$ y $81,76 \pm 3,35\%$ de la masa original mientras que 6E en PBS retuvo $102,45\% \pm 12,50\%$. La adición de RGD a los geles de seda pareció que disminuía ligeramente la retención de masa de estos materiales cuando se sometió a bioresorción proteolítica (Figura 5C). Las muestras 4E retuvieron significativamente más masa que 4RM y 4RH en el Día 2 ya que retuvieron $90,6 \pm 9,24\%$, $74,47 \pm 4,55\%$ y $71,23 \pm 6,06\%$ de las masas iniciales respectivamente. No hubo diferencias significativas adicionales en las muestras 4E respecto a las muestras 4RM y 4RH durante el curso del ensayo de bioresorción.

Las muestras de gel tratadas con 23RGD presentan una tendencia hacia una bioresorción más rápida en las restricciones de este ensayo particular. Esto se ilustró a la concentración de seda de 4% (Figura 6) y se confirmó a una concentración de fibroína de seda del 6% en los materiales de gel (Figura 7). Esta tendencia se vio reforzada por las diferencias significativas en las proporciones de bioresorción de las muestras potenciadas con 23RGD registradas por ANOVA de dos vías usando un ensayo posterior de Bonferroni ($p < 0,05$), particularmente con seda al 6%. El comportamiento único atribuido a los materiales potenciados con 23RGD puede deberse en parte a su estructura proteica única, ya que el método de bioresorción considera que las partículas por debajo de un tamaño de 50 µm se bioresorben, independientemente de su estabilidad. Puede ser posible que una estructura rica en láminas beta que existe en los geles 23RGD se esté rompiendo en regiones pequeñas, discretas, por regiones interferentes de estructura de hélice α y espiral al azar que se bioresorben más rápido, creando una plétora de fragmentos muy pequeños, no resorbidos en disolución.

La bioresorción *in vitro* de las muestras 4P y 4E mostró que ambos materiales tenían una resistencia similar a la proteólisis (Figura 5A). Esto es indicativo de que el proceso básico de gelificación potenciada con etanol es capaz de generar una estructura de gel rápidamente sin sacrificar propiedades importantes del material. También se mostró que el incremento de la concentración de seda en los geles EEG de 2% a 4% a 6% en 2E, 4E y 6E respectivamente, disminuía sustancialmente la pérdida de masa por bioresorción de la muestra (Figura 5B). Esto se puede correlacionar con una estructura de gel más homogénea, estable y fuerte, o simplemente con una mayor cantidad de moléculas de seda que se van a escindir por las proteasas con el fin de bioresorber las muestras. En cualquier caso, estos datos indican claramente un potencial para personalizar la escala de tiempo de la bioresorción de un material de gel de seda mediante la alteración del contenido de proteína de seda de los geles. También se ilustró que una exposición de 4 días a PBS no alteró de manera apreciable la masa de las muestras 6E, proporcionando una indicación preliminar de que las muestras EEG no se degradan sustancialmente por hidrólisis. Esto es un refuerzo adicional de la estabilidad e integridad bruta de estos geles de seda ya que muchos materiales de gel presentan una resiliencia limitada *in vivo* debido a una alta

susceptibilidad a hidrólisis. Se mostró que la adición de cantidades crecientes de RGD a los geles de seda incrementa ligeramente las proporciones de pérdida de masa por bioresorción comparando 4E, 4RM y 4RH (Figura 5C). Este comportamiento indica que pueden existir algunas diferencias estructurales entre los geles RGDEEG y EEG que causan una menor pérdida de masa en los geles EEG comparado con RGDEEG en este ensayo de bioresorción. Esto puede estar relacionado directamente con la idea propuesta previamente de que los materiales RGDEEG consisten en muchas regiones pequeñas de estructura de lámina β robusta unidas de manera laxa entre sí por una matriz de inter-conexión débil de estructuras de hélice α y espiral al azar no ordenadas. Esto aparece en contraste con los materiales EEG, que se piensa que se ensamblan a partir de precipitados similares, aunque menos prominentes y numerosos en una estructura por lo tanto más homogénea que los geles RGDEEG. La matriz de inter-conexión de los geles RGDEEG es por lo tanto más susceptible a una bioresorción rápida mediante este ensayo proteolítico que los geles EEG. Aunque las regiones de lámina β pueden permanecer intactas en los geles RGDEEG, la integridad del material bruto se pierde ya que la red de inter-conexión se resorbe como las partículas de lámina β residuales debido al método de tamizado usado como un punto de corte para el tamaño de partículas del producto de degradación. Esto es indicativo de que es posible usar varios niveles de RGD con el fin de manipular adicionalmente la estructura y perfil de bioresorción de un gel de seda.

Ejemplo 8

Captura del Espectro de Infrarrojo con Transformada de Fourier

Los hidrogeles de seda, potenciados con 23RGD-etanol de seda al 4%, 3:1 y 10:1, se moldearon como se ha descrito anteriormente y se sometieron a bioresorción proteolítica como se ha descrito anteriormente. Además, se obtuvieron muestras control no bioresorbidas con el objetivo de análisis mediante FTIR en cantidades de 0,5 ml cada una. Usando un espectrofotómetro Bruker Equinox 55 (Bruker Optics, Inc., Billerica, MA) acoplado con un cristal de germanio Pike MIRACLE™ (PIKE Technologies, Madison, WI), se obtuvieron los espectros de absorbancia de las muestras. Se obtuvieron imágenes de las muestras presionándolas sobre el cristal mediante un brazo de presión hasta que los escaneos de muestras únicas indicaron una señal viable del material y realizando una integración 128 escaneos. La resolución se ajustó a 4 cm^{-1} con un intervalo de 1 cm^{-1} de un intervalo de 4.000 cm^{-1} a 400 cm^{-1} .

Los espectros resultantes se sometieron a análisis mediante software OPUS 4.2 (Bruker Optics, Inc). Una encontrada del pico se usó para identificar picos entre 4.000 cm^{-1} y 600 cm^{-1} , siendo los criterios de búsqueda la selección automática de puntos de inflexión locales de una segunda derivada, función de suavizado de nueve puntos. La sensibilidad del programa se ajustó a 3,5% para todos los espectros tomando como base la discreción del operador respecto a la magnitud de los picos identificados y relevancia probable para la identificación del compuesto y "huella".

Cada una de las muestras sometidas a análisis por FTIR presentó un espectro con picos muy pronunciados en la banda Amida I ($1.600\text{--}1.700\text{ cm}^{-1}$) (Figura 8). Además, los números de onda específicos de estos picos son consistentes entre el hidrogel de fibroína de seda infundido con 23RGD y otros grupos de geles de seda. Todas las muestras presentan picos principales a $\sim 1.622\text{ cm}^{-1}$ y un pico menor/región toe a $\sim 1.700\text{ cm}^{-1}$, un patrón asociado con un alto grado de estructura de lámina β en una muestra (Figura 8). También existen similitudes en todos los tipos de muestras en la banda Amida II con un pico principal a $\sim 1.514\text{ cm}^{-1}$.

El uso del proceso EEG para producir geles de seda no influyó dramáticamente en la estructura secundaria del gel pero incrementó ligeramente la resistencia de la formulación de gel a la bioresorción proteolítica (Figura 9A). La evaluación de los espectros FTIR característicos de los geles 4P y 4E en el Día 0 reveló pocas características distintivas ya que ambas formulaciones presentaron un pico característico de lámina β alrededor de 1.622 cm^{-1} y una región toe de giro β a 1.700 cm^{-1} . Cada muestra también tuvo partes adicionales de lámina β , giro β , hélice α y espiral al azar no ordenado a 1.677 cm^{-1} , 1.663 cm^{-1} , 1.654 cm^{-1} y 1.645 cm^{-1} respectivamente con mayores cantidades relativas de hélice α y espiral al azar apareciendo en 4P que en 4E en el Día 0. En el Día 4, ambas muestras mostraron disminuciones pronunciadas en la señal a 1.677 cm^{-1} de lámina β , giro β , hélice α y espiral al azar, aunque este 4P presentó esto en un grado mayor que 4E, lo que indica una resorción preferente de estos restos y mayor resistencia a esto en los geles 4E.

El incremento de la concentración final de seda de los geles EEG tuvo un pequeño impacto en la estructura secundaria inicial del gel, aunque hubo un incremento pronunciado en las estructuras de lámina β en el Día 4 con concentraciones de seda mayores (Figura 9B). En el Día 0, los geles 2E, 4E y 6E mostraron todos una señal fuerte para 1.622 cm^{-1} de lámina β y 1.700 cm^{-1} para giro β fuerte, teniendo 6E picos particularmente prominentes en estas regiones. Cada muestra también tuvo partes adicionales de 1.677 cm^{-1} de lámina β , 1.663 cm^{-1} de giro β , hélice α y espiral al azar no ordenado. En el Día 4, todos los geles mostraron disminuciones en los picos 1.677 cm^{-1} de lámina β , 1.663 cm^{-1} de giro β , hélice α y espiral al azar respecto a los picos 1.622 cm^{-1} de lámina β y giro β siendo este comportamiento más marcado en 4E y 6E que en 2E. La muestra 6E en el Día 4 también mostró una estructura de lámina β más estable indicada por un desplazamiento del pico a un número de onda menor a $\sim 1.620\text{ cm}^{-1}$.

Las diferencias pronunciadas en los espectros potenciados con 23RGD-etanol y potenciado con etanol sólo fueron evidentes después de un periodo de cuatro días de bioresorción en proteasa. Las muestras del día 4 presentaron diferencias principalmente en el orden de magnitud de determinadas modalidades de estructura secundaria observadas mediante ligeras diferencias en la forma de la banda Amida I de FTIR. En el día 4, las muestras potenciadas con 23RGD-etanol presentan altos niveles de estructura de giro β evidenciadas por picos mucho más pronunciados y distintos a $\sim 1.700 \text{ cm}^{-1}$ mientras que también muestran niveles considerablemente menores de estructura de hélice α (1.654 cm^{-1}) y estructuras de espiral al azar no ordenado (1.654 cm^{-1}). Por ejemplo, los espectros FTIR de 4E, 4RM y 4RH muestran todas estructuras similares presentando 1.622 cm^{-1} lámina β y 1.700 cm^{-1} giro β de manera prominente con indicaciones de estructuras secundarias 1.677 cm^{-1} de lámina β , 1.663 cm^{-1} de giro β , hélice α y espiral al azar no ordenado (Figura 9C). En el Día 4, tanto 4RM como 4RH muestran un componente menos pronunciado 1.677 cm^{-1} de lámina β , 1.663 cm^{-1} de giro β , hélice α y espiral al azar que la muestra 4E con 4RH también mostrando una estructura de lámina β más estable, indicada por un desplazamiento del pico a un número de onda menor a $\sim 1.620 \text{ cm}^{-1}$. Además, se produjo un desplazamiento de pico tanto en las muestras potenciadas con 10:1 23RGD-etanol como potenciadas con etanol en el pico de lámina β a 1.622 cm^{-1} , indicativo de una estabilidad incrementada de lámina β . Considerado en conjunto, los desplazamientos de pico colectivos y las magnitudes de los picos observadas en los espectros en el día 4 comparado con el día 0, todos los tipos de gel experimentaron un reforzamiento sustancial del componente de lámina β , debido probablemente a la eliminación de la hélice α y espiral al azar menos estables. Estos efectos fueron más pronunciados en los materiales de gel potenciados con 23RGD, debido probablemente a diferencias intrínsecas en la organización inicial de la red estructural de los materiales de gel.

El análisis FTIR y la comparación de PG, EEG y RGDEEG mostraron similitudes de comportamiento fuertes a lo largo de todos los grupos de geles. Cada material presentó estructuras proteicas secundarias dominadas por lámina β , presentando elementos de estructuras de hélice α y espiral al azar y cada una se resorbió de manera tal que las cantidades de estructura rica en lámina β se incrementaron respecto a las estructuras de hélice α y espiral al azar. La bioresorción selectiva de las estructuras de hélice α y espiral al azar indica que probablemente se degradan favorablemente por proteólisis respecto a las estructuras de lámina β , así el perfil de bioresorción de un gel podría estar influido por la alteración del equilibrio entre los restos de lámina β y la combinación de estructuras de hélice α y espiral al azar. Una evaluación de etanol como acelerante reveló un efecto mínimo en la estructura del gel en el Día 0 ya que tanto 4P como 4E tenían altos contenidos en lámina β con estructuras de hélice α y espiral al azar (Figura 9A). En el Día 4 sin embargo, hubo un contenido relativo de lámina β ligeramente mayor en las muestras 4E y 4P. Esto puede estar causado por diferencias estructurales en las formulaciones 4E y 4P que eran imperceptibles en el Día 0 por ATR-FTIR, posiblemente en la uniformidad y homogeneidad de los geles de seda. Es posible que las mismas diferencias postuladas entre los geles EEG y RGDEEG derivadas de sus diferentes grados de formación de precipitado/punto de nucleación en la fase temprana de la gelificación también causen diferencias entre los materiales PG y EEG. Como las muestras PG no están aceleradas, es probable que se formarán muy pocos puntos de nucleación rápidamente y como resultado, el proceso de gelificación se produce de una manera muy lenta pero homogénea, permitiendo un empaquetamiento estérico óptimo de las moléculas de seda a lo largo del volumen de la disolución. Esto resulta en una estructura proteica consistente a lo largo del volumen final del gel, correspondiente a una buena integridad del material bruto. Esto contrastaría con los geles EEG, ya que el fenómeno de nucleación postulado previamente asociado con los materiales RGDEEG también ocurre probablemente con los materiales EEG, aunque de una manera menos prominente. Esto resulta en una distribución no uniforme de regiones altamente organizadas de lámina β mantenidas juntas por estructuras de hélice α y espiral al azar en los materiales EEG respecto a los materiales PG, con hélice α y espiral al azar degradándose más rápidamente que la lámina β . Esto está de acuerdo con estudios previos que han mostrado que las estructuras de lámina β y las estructuras de hélice α poco empaquetadas son más susceptibles a la degradación. El incremento de la concentración de seda en los geles EEG de 2E a 4E a 6E reveló las estructuras de lámina β más prominentes en 6E tanto en el Día 0 como en el Día 4 mientras que 2E tuvo considerablemente más hélice α y espiral al azar en ambos días que 2E y 4E (Figura 9B). Esto parecería indicar que las concentraciones diluidas de seda en el hidrogel final resultan en una estructura secundaria empaquetada menos densamente, debido posiblemente a la libertad estérica en el volumen del gel respecto a los estados de 4% y 6%. Esto indica que la concentración de seda puede usarse para manipular la estructura secundaria del gel de seda para influir en la bioresorción. Un estudio del efecto de una concentración creciente de RGD indicó que aunque los geles eran virtualmente idénticos en el Día 0, la estructura de hélice α y espiral al azar no ordenada en los geles 4RM y 4RH fueron menos resistentes a la bioresorción que en 4E como se observa en el Día 4 (Figura 9C). Esto también podría explicarse por falta de homogeneidad en los geles 4RM y 4RH respecto a 4E como se ha mencionado previamente. Esto puede ser particularmente probable a la vista de la formación de precipitados observada en las muestras RGDEEG. Estos datos pueden ser indicativos de que RGD o un péptido similar podría usarse para personalizar adicionalmente la naturaleza del perfil de bioresorción de los geles de seda.

Estos resultados indican que los geles de seda producidos mediante PG, EEG y RGDEEG resultan de un proceso de ensamblaje de dos fases que consiste en nucleación y agregación. Los geles de seda contienen predominantemente

estructura de lámina β que es más resistente a la bioresorción *in vitro* que la hélice α y espiral al azar. Los geles EEG se forman más rápidamente que PG, debido probablemente a un evento de precipitación y nucleación más rápido mediado por los efectos del etanol en la fase de disolvente de la disolución. Los geles EEG forman una estructura no homogénea que probablemente consiste en regiones de lámina β localizadas, inicialmente precipitadas inter-conectadas por hélice α y espiral al azar ensambladas posteriormente. Los geles RGDEEG forman una estructura no homogénea que probablemente consiste en regiones de lámina β localizadas, inicialmente precipitadas inter-conectadas por hélice α y espiral al azar ensambladas posteriormente. Los geles RGDEEG alcanzan la finalización más lentamente que los geles EEG debido a interferencia estérica mediada por RGD encontrada en el ensamblaje del gel después de la nucleación. Los geles RGDEEG son menos homogéneos que los geles EEG debido a estas dificultades asociadas con el ensamblaje en una fase tardía.

Ejemplo 9

Procesamiento de Gel Inyectable

Los hidrogeles de seda se prepararon como se ha descrito anteriormente en los Ejemplos 1-4. Los geles se pulverizaron moliendo el gel de seda hasta una pasta usando una espátula de acero inoxidable. Se calculó la masa de las formulaciones de gel incluyendo PBS con una balanza SI-215 (Denver Instrument, Denver CO) y el porcentaje de volumen correcto de PBS (Invitrogen Corporation, Carlsbad, CA) se mezcló con la asunción de que tanto el gel como el PBS tenían una densidad de 1 g/ml. Los hidrogeles de seda que se iban a usar para la evaluación *in vivo* se sometieron a pulverización mecánica vigorosa mediante una varilla de agitación de acero inoxidable. Cuando se especifica que contienen un componente salino, los geles se mezclaron con salino a proporciones volumétricas tomando como base el volumen original del gel (es decir, antes de la disrupción mecánica) después de la pulverización con la barra de acero inoxidable. Esta adición de salino tamponado con fosfato sirve para regular la tonicidad del gel así como para mejorar la inyectabilidad. Después de esta pulverización inicial, el gel se alteró adicionalmente mediante la inyección repetida a través de una aguja con un calibre 26 con el fin de disminuir el tamaño global de las partículas en el gel y mejorar las características de inyectabilidad. En algunas muestras, el gel se alteró adicionalmente mediante la inyección repetida en primer lugar a través de una aguja de 18g repetidamente hasta que el gel fluyó fácilmente y después el material se cicló de manera similar a través de una aguja de 23g y una aguja de 26g.

Ejemplo 10

Investigación *in vivo* del Hidrogel de Seda en Modelos de Roedores

Las muestras de gel de seda que se habían procesado para implante o inyección *in vivo* como se ha descrito en el Ejemplo 9 se embolsaron doblemente con bolsas de esterilización apropiadas para irradiación gamma y se esterilizaron por exposición a una dosis de 25 kGy de radiación gamma.

En un estudio, las muestras de hidrogel de seda, tanto potenciadas con 23RGD como nativas, se implantaron subcutáneamente en ratas Lewis macho que tenían un peso medio de 400 g. Esto se hizo según el protocolo# 86-04 registrado en el Department of Laboratory Animal Medicine (DLAM) del New England Medical Center y aprobado por el Institutional Animal Care and Use Committee (IACUC). En el día de la cirugía, los animales se anestesiaron mediante una disolución de ketamina/xilazina inyectada IM en las patas posteriores de los animales. Después de la administración de la anestesia, la piel de las ratas se afeitó a fondo y se frotó con alcohol, se permitió que se secase, se frotó con el microbicida BETADINE® (Purdue Pharma, Stamford, CT) y se cubrió con toallas estériles. En el caso de los dispositivos implantados, se hicieron dos incisiones en la línea media dorsal directamente sobre la columna vertebral, la primera 0,5 cm por debajo de los hombros y la segunda 2,5 cm por encima de la cresta pélvica, cada una de 1 cm de longitud. Las incisiones se expandieron en bolsillos de 1 cm de profundidad usando una técnica de disección roma por debajo del panniculus carnosus a cada lado dando lugar a 4 sitios potenciales de implante. Los implantes, 3 por animal; cada uno con un tamaño de 1 cm x 1 cm x 0,3 cm, se insertaron en los bolsillos sin fijación con el sitio final sometido a la misma disección pero reemplazando el implante con 0,5 mL de disolución salina estéril. La piel se cerró con suturas absorbibles interrumpidas. Dependiendo del estudio, las muestras se recogieron a los 7 días, 14 días, 28 días y/o 57 días después de la cirugía de implante. Se recogieron observaciones macroscópicas dos veces por semana respecto a la apariencia del sitio del implante. Después de la recogida de las muestras, se realizaron observaciones macroscópicas de los implantes y las muestras se procesaron para evaluación histológica. El análisis de los portas histológicos fue proporcionado por un patólogo veterinario experimentado.

Las secciones se puntuaron para presencia (0= ninguna, 1= presente) de la mineralización del implante, formación de quistes, fibrosis, hiperplasia de células sebáceas y atrofia folicular focal. Además, se puntuaron la densidad de la respuesta inflamatoria (0= ninguna... 5= extensa) y el grado de hiperplasia epidérmica (0= ninguna... 3= extensa). Estos datos se indicaron como porcentajes de la mayor puntuación posible para el grupo de portas. También se examinaron las secciones para la presencia de cualquier tipo de célula característica particular incluyendo linfocitos, neutrófilos,

eosinófilos, células gigantes mononucleadas, macrófagos y fibroblastos. Se incluyó un comentario adicional relevante para la respuesta del huésped según el criterio del patólogo supervisor. Se usó Prism 4.03 (GraphPad Software Inc., San Diego, CA) para realizar el análisis de la varianza (ANOVA) con un umbral de significancia ajustado a $p \leq 0,05$. Se usó ANOVA de una vía para comparar las diferencias en fuerzas de extrusión media para geles pulverizados. Para todos los ensayos, también se realizó un ensayo post-hoc de Tukey para comparaciones múltiples.

La Tabla 2 lista las formulaciones de gel de seda, tanto potenciadas con 23RGD-etanol como potenciadas con etanol desarrolladas y evaluadas intradérmicamente en un modelo de rata. Los geles de seda extraídos de ratas en el Día 7 eran visiblemente bien definidos y fácilmente identificables sin indicaciones macroscópicas de edema, eritema o eliminación transdérmica de material. No fue posible diferenciar los sitios del implante control de PBS del tejido circundante. Las secciones H&E de hidrogeles de fibroína de seda al 4% formados por gelificación pasiva (4P), hidrogeles de fibroína de seda al 4% formados por gelificación potenciada con etanol (4E) e hidrogeles de fibroína de seda al 6% formados por gelificación potenciada con etanol (6E) todas aparecieron similares, con una inflamación suave en todos los casos caracterizada por linfocitos, macrófagos, algunos neutrófilos y fibroblastos (Figura 10). Se observó infiltración celular en todos los tipos de muestras con penetración completa en 4P y crecimiento hacia el interior periférico hasta una profundidad de aproximadamente 100 μm en ambos geles EEG sin evidencia observada de formación de quistes. En todos los geles, una bioresorción temprana fue indicada por la erosión del borde del implante permaneciendo material de implante residual localizado en lagos grandes. La integración en el huésped del gel implantado había progresado en las muestras del Día 28 de 4E y 6E evidenciado por un mayor crecimiento hacia el interior celular en el material con penetración completa del implante en las muestras 4E y crecimiento hacia el interior periférico robusto en las muestras 6E. La respuesta celular en este punto de tiempo se caracterizó por fibroblastos, linfocitos y macrófagos con la adición de unas pocas células gigantes multi-nucleadas.

Nombre del Grupo	Concentración de Seda	Potenciador	Componente Salino
4E10	4%	Etanol 90%	10%
4R10		Etanol 90%, 1:1 23RGD	
4RH10		Etanol 90%, 3:1 23RGD	
4E25		Etanol 90%	25%
4R25		Etanol 90%, 1:1 23RGD	
4RH25		Etanol 90%, 3:1 23RGD	
6E10	6%	Etanol 90%	10%
6R10		Etanol 90%, 1:1 23RGD	
6E25		Etanol 90%	
6R25		Etanol 90%, 1:1 23RGD	
6RH25		Etanol 90%, 3:1 23RGD	

Las muestras de 4E y 6E del Día 57 mostraron una bioresorción continua por el huésped del material de gel ya que había poco 4E residual y aunque 6E permaneció visible en lagos grandes, intactos, el gel había sido penetrado completamente por el tejido del huésped. La respuesta del huésped a 4E había disminuido dramáticamente en celularidad entre el Día 28 y el Día 57 con muy poca evidencia de hiper celularidad en el Día 57 con algunos macrófagos y fibroblastos dispersos alrededor del sitio del implante. La patología de la respuesta del huésped de 6E fue similar a la respuesta del Día 28 a 4E, con los fibroblastos como el tipo celular predominante y linfocitos, macrófagos y células gigantes multi-nucleadas dispersos. Esto se observó como una respuesta inflamatoria de bajo grado, persistente, de tipo fibrótico al material.

Las muestras del gel potenciado con 23RGD presentaron una respuesta inflamatoria menos robusta en el punto de tiempo del día 14 en comparación con el gel no potenciado con 23RGD (Figura 11). Esto se observa mediante una disminución apreciable de la hiper-celularidad próxima al implante del gel y una disminución simultánea de la fragmentación del material de implante. Es posible que esta mejora en la integridad del implante se deba a una respuesta al cuerpo extraño menos robusta del animal huésped y también puede ser una evidencia de que existe menos

contracción mecánica del sitio del implante, un fenómeno observado comúnmente con biomateriales que incluyen el resto "RGD". Estos efectos indican que el potenciación por 23RGD de geles de seda da lugar a un material más biocompatible con mejores resultados de implante.

5 En un segundo estudio, se investigaron muestras de hidrogel de seda inyectadas intradérmicamente, tanto potenciadas con etanol como potenciadas con 23RGD-etanol y materiales control relevantes usando cobayas Hartley machos. Esto se hizo según el protocolo# 29-05 registrado en el Department of Laboratory Animal Medicine (DLAM) del New England Medical Center y aprobado por el Institutional Animal Care and Use Committee (IACUC). Brevemente, cobayas Hartley machos que pesaban 300-350g se anestesiaron mediante una mezcla de ketamina/xilazina inyectada intramuscularmente en las patas posteriores de los animales. La piel dorsal de los cobayas se afeitó a fondo y se frotó con alcohol, se permitió que se secase, se frotó con el microbicida BETADINE® o Chloraprep (Enturia, Inc., Leawood, KS) y se cubrió con toallas estériles. Un volumen de 50 µL de material deseado se inyectó a través de una aguja de 26g en seis sitios diferentes a lo largo del lado izquierdo del lomo del animal. Se hicieron inyecciones adicionales de un control de gel de seda apropiado en los seis sitios contralaterales. La explicación de los geles de seda se realizó a los 28 días después del implante. Se recogieron observaciones macroscópicas dos veces por semana respecto a la apariencia del sitio del implante. Después de la recogida de las muestras, se realizaron observaciones macroscópicas de los implantes y las muestras se procesaron para evaluación histológica. El análisis de los portas histológicos fue proporcionado por un patólogo veterinario experimentado. La puntuación y el análisis estadístico se realizaron como se ha descrito anteriormente.

20 La Tabla 3 lista las formulaciones de gel de seda, tanto potenciadas con 23RGD-etanol como potenciadas con etanol desarrolladas y evaluadas intradérmicamente en un modelo de cobaya en un cribado de veintiocho días. Aunque no se identificaron diferencias estadísticamente significativas, los datos tanto para las observaciones macroscópicas como la histología (Tablas 4 y 5) indican una tendencia general que apoya los datos previos de que el potenciamiento con 23RGD del gel mejora la biocompatibilidad del material. Entre los sitios implantados con gel de seda, los resultados macroscópicos variaron. Las proporciones de ulceración y pérdida de pelo fueron menores en los grupos con PBS al 25% comparado con salino al 10%, seda al 6% comparado con seda al 4% y moldeado RGDEEG comparado con sólo moldeado EEG (Tabla 4). Las proporciones de enrojecimiento del sitio siguieron un patrón similar con la excepción de que las muestras RGDEEG indujeron más enrojecimiento del sitio que las muestras EEG. Todos los geles de seda mostraron evidencia de formación de quiste epidérmico, fibrosis, hiperplasia epidérmica e inflamación pronunciada con trazas de atrofia folicular en todas las muestras EEG. La hiperplasia de células sebáceas estuvo presente en un grado limitado en todas las formulaciones con la excepción de seda al 6%, salino al 10%, 1:1 23RGD (Tabla 5). Esto es particularmente evidente en el caso de los geles de seda de seda al 4% con salino al 25% añadido y bien potenciados con un potenciador basado en etanol o con un potenciador basado en 23RGD-etanol y, más específicamente, en el caso de ulceraciones del sitio (Tabla 5). Este material indicó mejoras fuertes con concentración creciente de 23RGD en el número de sitios con ulceraciones a lo largo del curso del estudio. Estos resultados son indicativos de que el uso de 23RGD conjuntamente con un potenciador de etanol proporciona un resultado mejorado cuando se compara con un potenciador de etanol solo.

Tabla 3. Formulaciones de Hidrogel de Seda

Nombre del Grupo	Concentración de Seda	Potenciador	Componente Salino
4E10	4%	Etanol 90%	10%
4R10		Etanol 90%, 1:1 23RGD	
4E25		Etanol 90%	25%
4R25		Etanol 90%, 1:1 23RGD	
4RH25		Etanol 90%, 3:1 23RGD	
6E10	6%	Etanol 90%	10%
6R10		Etanol 90%, 1:1 23RGD	
6E25		Etanol 90%	25%
6R25		Etanol 90%, 1:1 23RGD	

Nombre del Grupo	Enrojecimiento del Sitio	Pérdida de Pelo	Palpabilidad	Ulceración
4E10	38%	58%	65%	33%
4R10	57%	49%	67%	33%
4E25	28%	34%	49%	28%
4R25	44%	34%	64%	17%
4RH25	50%	23%	66%	6%
6E10	63%	52%	68%	33%
6R10	78%	51%	68%	22%
6E25	33%	31%	69%	11%
6R25	56%	30%	68%	13%
HYLAFORM™	6%	12%	63%	0%
ZYPLAST™	17%	10%	52%	0%

Nombre del Grupo	Formación de Quistes Epidérmicos	Fibrosis	Inflamación	Hiperplasia Epidérmica	Atrofia Folicular	Hiperplasia Sebácea
4E10	22%	100%	70%	59%	11%	22%
4R10	74%	100%	62%	67%	0%	14%
4E25	50%	100%	69%	67%	13%	13%
4R25	29%	100%	39%	62%	0%	14%
4RH25	14%	100%	64%	50%	0%	43%
6E10	44%	100%	70%	56%	11%	33%
6R10	25%	100%	63%	38%	0%	0%
6E25	30%	100%	60%	40%	10%	20%
6R25	29%	100%	64%	33%	0%	14%
HYLAFORM™	0%	0%	3%	6%	0%	0%
ZYPLAST™	0%	25%	28%	31%	0%	0%

Un tercer estudio también usó cobayas Hartley macho para investigar muestras del hidrogel de seda inyectadas intradérmicamente como se ha descrito anteriormente, comparando muestras de geles de seda con seda al 4% y 6%, salino al 25% potenciados con 3:1 23RGD-etanol con un material control basado en colágeno, ZYPLAST™ (Allergan Inc., Irvine CA) e HYLAFORM™ (Allergan Inc., Irvine CA). La explicación de los geles de seda se realizó a 92 días después del implante. Se recogieron observaciones macroscópicas dos veces por semana respecto a la apariencia del sitio del implante. Después de la recogida de las muestras, se realizaron observaciones macroscópicas de los implantes y las muestras se procesaron para evaluación histológica. Durante el curso del estudio de 92 días, ninguno de los 24 sitios de implante, bien hidrogel potenciado con 23RGD-etanol o ZYPLAST™, se ulceró. La histología reveló que el 75%

de todos los sitios ZYPLAST™ tenía material residual como el 75% de todos los sitios de gel de seda potenciado con 23RGD-etanol (tanto al 4% como al 6%). Ambos materiales presentaron respuestas celulares de fase crónica muy similares, ya que los sitios se caracterizaron por una reacción fibrótica suave con abundante deposición de colágeno en y alrededor del sitio del implante (Figura 12). El colágeno aparecía menos ordenado de lo que lo hace en el retículo dérmico circundante tomando como base la densidad del color cuando se vio con tinción de Tricromo y también cuando se vio bajo luz polarizada. Los sitios de gel de seda tuvieron puntuaciones de palpabilidad similares a ambos materiales control pero presentaron proporciones más altas de enrojecimiento del sitio, pérdida de pelo y ulceración de lo que lo hicieron ZYPLAST™ e HYLAFORM™. Estos resultados no sólo refuerzan que el gel de seda potenciado con 23RGD-etanol es biocompatible, sino que también indican que es comparable a biomateriales de colágeno en términos de su persistencia y comportamiento a largo plazo *in vivo*.

ZYPLAST™ no presentó quistes epidérmicos, atrofia folicular o hiperplasia de células sebáceas, aunque mostró pequeños niveles de fibrosis, inflamación e hiperplasia epidérmica. El examen de las secciones histológicas mostró material de gel de seda residual que se tiñó de una manera eosinofílica suave y apareció como grandes lagos de material en una localización central con masas menores de material distribuidas más ampliamente a lo largo de la dermis reticular (Figura 13). Estas masas menores estaban rodeadas típicamente por fibroblastos y macrófagos con células gigantes multi-nucleadas ocasionalmente presentes. También estaban localizados eosinófilos cerca de estas masas menores de implante. En general, la respuesta del huésped a los geles de fibroína de seda se caracterizó como poblaciones medianamente fibróticas e incluidas de fibroblastos, linfocitos, macrófagos, células gigantes multi-nucleadas y eosinófilos. Fue evidente una pequeña diferencia entre los tipos de gel de seda excepto en términos del grado de eosinofilia. Se observaron poblaciones de eosinófilos mayores para geles de seda la 6% comparado con 4% y también se observó que se incrementaban con la concentración de RGD en las muestras de gel de seda tanto en el grupo 4% como 6%. ZYPLAST™ presentó una tinción eosinofílica fuerte y estaba distribuido como grandes lagos en la dermis reticular con masas menores a lo largo del área. La hiper celularidad cerca del sitio de inyección fue menor en las muestras ZYPLAST™ cuando se comparan con el gel de seda. Estaban presentes fibroblastos, linfocitos, macrófagos, células gigantes multi-nucleadas y eosinófilos con una menor tendencia a localizarse en la periferia del implante. Las muestras HYLAFORM™ examinadas mostraron muchas masas muy pequeñas de material a lo largo de la dermis reticular. HYLAFORM™ no presentó quistes epidérmicos, fibrosis, atrofia folicular o hiperplasia de células sebáceas, con casos extremadamente limitados de inflamación e hiperplasia epidérmica. No hubo hiper celularidad observable cerca del material implantado u otra evidencia de inflamación en los sitios del implante.

En el día 92, la evaluación histológica de las muestras de hidrogel de fibroína de seda, 3:1 23RGD, salino al 25% (4RH25) y las muestras ZYPLAST™ mostró una persistencia del material y respuesta del huésped similares (Figura 14). Muy poco material implantado permanecía visible en la dermis de los animales sin hiper celularidad presente en este punto de tiempo, evidencia de hiperplasia o inflamación celular. Los eosinófilos encontrados en el día 28 en las muestras de ZYPLAST™ y gel de seda no se observaron en el día 92. De forma particularmente interesante, 4RH25 también presentó disrupción residual en la dermis reticular en la forma de un patrón de colágeno irregular cerca del material implantado. La desorganización del colágeno se observó como una región de colágeno teñido que se veía desprovista del típico patrón en trama de la dermis reticular normal (Figura 14C). Esta desorganización se confirmó cuando se observaron las secciones histológicas bajo luz polarizada apareciendo el colágeno desorganizado como una interrupción en la birrefringencia asociada con la dermis reticular circundante (Figura 14D).

Ejemplo 11

Formulación de Gel Inyectable Potenciada

Los hidrogeles de seda se prepararon como se ha descrito anteriormente en los Ejemplos 1-4. Una vez procesados, los geles se dimensionaron en partículas gruesas o finas usando una etapa de tamizado (Tabla 6). Los materiales de gel se presionaron a través de un tamiz de tela de alambre de acero inoxidable 316SS con una espátula de acero inoxidable y en placas Petri de poliestireno limpias. Se usaron tamices con tamaños de hueco de 711 μm x 711 μm , 295 μm x 295 μm , 104 μm x 104 μm y 74 μm x 74 μm . Después de pasar a través del tamiz con hueco 74 μm x 74 μm , el material se consideró procesado a un estado "grueso". Las muestras que se iban a procesar a un estado "fino" se forzaron adicionalmente a través de un tamiz 43 μm x 43 μm de la misma forma. Este tamizado se realizó cuatro veces separadas para cada tipo de muestra, usando cada tamizado una cantidad aproximada de 0,5 mL de material de gel.

Porcentaje Nominal de Masa de Seda	Proporción Molar de 23RGD con Seda	Finura	Nombre del Grupo
2%	1:1	Fino	2RF
4%	0		4F
	1:1	Grueso	4RC
		Fino	4RF
	3:1		RHRF
	10:1		4VHRF
8%	1:1	Grueso	8RC
		Fino	8RF

Las muestras de material de gel de seda (N= 4 de cada tipo) se evaluaron bajo microscopía óptica. Brevemente, se calculó la masa de una parte de 100 mg de gel de seda o dispositivo control usando una balanza de la serie SI-215 Summit. Este material se cargó en el extremo posterior abierto de una jeringa de 3 mL usando una espátula de acero inoxidable. El émbolo se reemplazó en la jeringa, se unió una aguja de 18g al extremo de la jeringa y se cogieron aproximadamente 900 μ L de agua ultra-pura. Esta mezcla de agua y gel de seda mezcló mediante agitación suave. Después de mezclar para suspender uniformemente, se puso una muestra de aproximadamente 30 μ L de gel de seda diluido en un micro portaobjetos de 75 mm x 25 mm con una cara esmerilada, pre-lavado (Fisher Scientific Co., Waltham MA) y se cubrió con un cubreobjetos de vidrio de 22 mm x 40 mm (Corning Inc., Corning, NY). Se obtuvo imagen de este portaobjetos de muestra con un microscopio. Se obtuvieron imágenes de los portaobjetos de muestra usando un System Microscope Modelo BX41 (Olympus, Melville, NY) conjuntamente con una Cámara Microscope PC MACROFIRE™ Modelo S99831 (Optronics, Goleta, CA) y software PICTUREFRAME™ 2.1 (Optronics, Goleta, CA). Brevemente, los portaobjetos se escanearon para partículas de gel claramente separadas usando la lente del objetivo 4x y se determinaron las localizaciones para una serie de 3 imágenes representativas del portaobjetos de muestra. Se obtuvieron imágenes de cada una de estas localizaciones después de cambiar previamente la lente del objetivo del microscopio a 10x. Los archivos de imágenes micrográficas se sometieron a análisis con software IMAGE-PRO® Plus 5.1 (Media Cybernetics, Inc., Silver Spring, MD). Los archivos de imágenes se comprobaron para distribución del tamaño de las partículas, tamaño medio de las partículas, proporción media de aspecto, tamaño máximo de las partículas, tamaño mínimo de las partículas y desviación estándar del tamaño de las partículas. Un resumen de los datos se presenta en la Tabla 7.

Nombre del Grupo	Área del Objeto Min a Max (μm^2)	Área Media del Objeto (μm^2)
2RF	5,33 a $1,32 \times 10^4$	$52,43 \pm 261,82$
4F	5,33 a $8,07 \times 10^3$	$27,82 \pm 129,34$
4RC	5,33 a $8,52 \times 10^3$	$38,41 \pm 196,67$
4RF	5,33 a $5,29 \times 10^3$	$34,12 \pm 135,31$
4HRF	5,33 a $7,51 \times 10^3$	$40,62 \pm 166,61$
4VHRF	5,33 a $3,14 \times 10^3$	$35,4 \pm 105,43$
8RC	5,33 a $8,04 \times 10^3$	$46,57 \pm 225,43$
8RF	5,33 a $2,85 \times 10^3$	$35,26 \pm 129,63$
ZYPLAST™	5,33 a $1,95 \times 10^3$	$22,08 \pm 41,71$

El examen de las partículas bajo microscopio óptico reveló algunas partículas de gel agrupadas que se eliminaron de los datos de dimensionado de las partículas manualmente. Los tamaños de las partículas variaron de $5,3$ a $1,3 \times 10^4 \mu\text{m}^2$, comparable en intervalo a ZYPLAST™ disponible comercialmente que varía de $5,3$ a $1,95 \times 10^3 \mu\text{m}^2$. Los datos también revelaron tamaños medios de las partículas que varían de $27,8 \mu\text{m}^2$ a $52,4 \mu\text{m}^2$, de nuevo, comparable con ZYPLAST™ con un tamaño medio de las partículas de $22,1 \mu\text{m}^2$. Estos datos ilustran que el gel de seda puede pulverizarse con éxito a tamaños de partículas pequeños y funcionalmente útiles de una manera similar a los materiales de gel inyectables utilizados actualmente. El método básico de tamizado forzado podría reemplazarse fácilmente por métodos más sofisticados, reproducibles para propósitos de aumento de escala.

Después de la pulverización y mezclado, las muestras de las emulsiones de gel de seda se sometieron a un ensayo de fuerza de extrusión. Los materiales de gel preparados como se ha descrito en los Ejemplos 1-4 se mezclaron con proporciones apropiadas de salino con el fin de evaluar los perfiles de fuerza de inyección (extrusión) respecto a un material control, ZYPLAST™ (Tabla 8). Esto se consiguió calculando la masa de 5 g del material de gel en un plato grande de pesada usando una balanza SI-215 (Denver Instrument, Denver, CO). Se añadirá una cantidad apropiada de salino para constituir el porcentaje de volumen correcto asumiendo que tanto el material de gel como el salino tienen una densidad de 1 g/mL . Este material se mezcló hasta una consistencia uniforme usando una espátula de acero inoxidable y se cargó en el extremo posterior de una jeringa de 10 mL que tenía una aguja de 18g unida para uso posterior.

Tabla 8. Generación del Perfil de Fuerza de Inyección del Gel de Seda

Masa Nominal de Seda	Proporción Molar de 23RGD con la Seda	Finura	Contenido de Salino	Nombre del Grupo
2%	1:1	Fino	25%	2RF25
4%	0		Grueso	25%
	1:1	Fino		25%
			0%	4RFO
			25%	4RF25
		50%	4RF50	
		3:1	25%	4HRF25
	10:1	25%	4VHRF25	
8%		Fino	25%	6RF25

Estas muestras se ensayaron usando un Instron 8511 (Instron Corp., Canton, MA) conjuntamente con software Serie IX y un marco de aluminio diseñado a medida unido a una celda de carga 100 N (Figura 15). Para el ensayo del material, se cargó 1 mL del material de la muestra de interés en una jeringa de vidrio hermética a gas de 1 mL . La jeringa con la muestra se montó en el marco de aluminio diseñado a medida montado en la unidad Instron y el material se extruyó. La muestra se comprobó para la fuerza requerida para extruir el gel en cada una de 3 tasas de deformación, 10 mm/minuto , 50 mm/minuto y 200 mm/minuto con un desplazamiento total del activador ajustado a 7 mm . Se corrieron una serie de cuatro ensayos en cada tipo de material a cada velocidad de desplazamiento del pistón. Los datos de desplazamiento de carga se recogieron a una frecuencia de 100 Hz y se presentan como la media \pm la desviación estándar de las 4 fuerzas medias de extrusión experimentadas en cada tipo de gel a cada tasa de deformación. La fuerza media de extrusión se definió como la carga media medida en la región del plató de la curva de desplazamiento de carga resultante de cada ensayo de extrusión. Los datos se indicaron como la cantidad media de fuerza requerida para la extrusión del material de muestra y se resumen en la Tabla 9 y la Figura 16.

30

Tabla 9. Fuerza Media (N) para Extruir Gel de Seda de Aguja 30g						
Nombre del Grupo	Velocidad de Desplazamiento del Émbolo					
	10mm/min		50mm/min		200mm/min	
	Media	Devest	Media	Devest	Media	Devest
2RF25	0,6	0,0	2,9	0,6	7,3	0,7
4RF25	3,7	2,0	4,5	1,3	22,4	6,7
4RD25	7,1	3,7	6,7	0,5	25,1	3,9
4RF0	9,5	1,0	28,5	3,1	66,2	10,0
4RF26	3,2	0,9	7,4	0,6	30,4	5,0
4RF50	1,2	0,2	2,7	0,1	10,1	0,3
4HRF25	2,2	0,4	8,9	1,0	22,0	0,6
4VHRF25	2,8	1,6	5,2	1,4	14,6	2,1
8RF25	3,6	0,7	10,1	1,3	29,2	2,4
ZYPLAST™	1,6	0,5	18,7	0,7	29,1	1,4

Una comparación entre las técnicas de molido reveló que no había diferencias significativas entre 4RC25 y 4RF25, teniendo fuerzas de extrusión medias de $7,1 \pm 3,7$ N y $3,2 \pm 0,9$ N a 10mm/min, $6,7 \pm 0,5$ N y $7,4 \pm 0,6$ N a 50mm/min y $25,1 \pm 3,9$ N y $30,4 \pm 5,0$ N a 200mm/min respectivamente (Tabla 6, Figura 16A). Estas dos formulaciones se diferenciaban significativamente ($p \leq 0,05$) de ZYPLAST™ a tasas de deformación de 10 y 50 mm/min, que tenía fuerzas de extrusión de $1,6 \pm 0,5$ N, $18,7 \pm 0,7$ N y $29,1 \pm 1,4$ N a 10, 50 y 200 mm/min de tasa de deformación.

Los datos respecto a la extrudabilidad de las formulaciones de gel de seda ilustraron claramente que la adición de salino como un fluido vehicular a las partículas de seda pulverizadas ofrece un grado mejorado de extrudabilidad, reduciendo sustancialmente la fuerza necesaria para extruir el gel de seda a todas las tasas de deformación. La adición de concentraciones crecientes de salino a los geles de seda pulverizados disminuyó significativamente la fuerza de extrusión requerida para los geles de seda a cada tasa de deformación, presentando los geles de nuevo un comportamiento de fluidización por cizallamiento (Tabla 9, Figura 16B). A todas las tasas de deformación, 4RF0 requirió significativamente más fuerza para extruir que 4RF25, que a su vez requirió significativamente más que 4RF50. A una tasa de deformación de 10mm/min, 4R0, 4R10 y 4R25 mostraron una disminución significativa ($p \leq 0,05$) en la fuerza de extrusión con concentración creciente de PBS, teniendo fuerzas medias de $9,5 \pm 3,1$ N, $6,1 \pm 0,5$ N y $4,7 \pm 0,7$ N respectivamente (Tabla 9). A 50mm/min, estas relaciones fueron más pronunciadas con fuerzas de extrusión medias de $14,0 \pm 0,9$ N, $5,4 \pm 0,7$ N y $3,9 \pm 0,2$ N respectivamente y todas se diferenciaron significativamente (Tabla 6, Figura 16). A 200mm/min, permaneció la tendencia ya que las fuerzas de extrusión medias fueron $26,4 \pm 4,5$ N, $10,61 \pm 1,6$ N y $6,4 \pm 0,5$ N respectivamente diferenciándose 0% de PBS significativamente de los otros dos grupos. Las muestras de 6R25 tuvieron una fuerza de extrusión media de $29,3 \pm 4,8$ N a 10 mm/min, significativamente mayor que 4R25 (Tabla 9). A 50 mm/min y 200 mm/min, la fuerza para extruir el 6R25 fue mayor de 80 N, lo que causó que el ensayo se abortara con el fin de evitar daño a la celda de carga.

Los datos también ilustran que el uso de concentraciones muy bajas de seda puede mejorar la extrudabilidad del gel respecto a concentraciones más altas como en el caso de 2RF25 comparado con 4RF25 y 8RF25. El incremento de la concentración de seda en los geles de seda pulverizados incrementó la fuerza de extrusión requerida para los geles de seda a cada tasa de deformación, con incrementos significativos entre 2RF25 y tanto 4RF25 como 8RF25 a 10 mm/min y 200 mm/min (Tabla 9, Figura 16C). Todos los grupos se diferenciaron significativamente a la tasa de deformación de 50 mm/min y los geles continuaron presentando un comportamiento de fluidización por cizallamiento, observado en las fuerzas de extrusión incrementadas asociadas con tasas de deformación incrementadas. A 10 mm/min, 2RF25 y 8RF25 requirieron $0,6 \pm 0,0$ N y $3,6 \pm 0,7$ N respectivamente, a 50 mm/min requirieron $2,9 \pm 0,6$ N y $10,1 \pm 1,3$ N y a 200 mm/min $7,3 \pm 0,6$ N y $29,2 \pm 2,4$ N.

Los datos indicaron además que el uso de 23RGD para potenciar el material de gel de seda no influyó apreciablemente en la fuerza necesaria para extruir las formulaciones de gel de seda. La adición de concentraciones crecientes de RGD

no tuvo un efecto consistente en la fuerza de extrusión necesaria para los materiales de gel (Tabla 9, Figura 16D). A una tasa de deformación de 10 mm/min no existieron diferencias significativas entre 4F25 a $3,7 \pm 2,0$ N, 4R25, 4HR25 a $2,2 \pm 0,4$ N y 4VHR25 a $2,8 \pm 1,6$ N. A una tasa de deformación de 50 mm/min 4HR25 fue significativamente mayor que todas las demás fuerzas de extrusión a $8,9 \pm 1,0$ N comparado con 4F25 a $4,5 \pm 1,3$ N, 4R25 y 4VHR25 a $5,2 \pm 1,4$ N. A una tasa de deformación de 200 mm/min, 4HR25 a $22,0 \pm 0,6$ N fue significativamente mayor sólo que 4VHR25 a $14,6 \pm 2,1$ N comparado con 4F25 a $22,4 \pm 6,7$ N y 4R25.

Por último, los datos mostraron que los geles de seda mezclados con salino tenían una extrudabilidad muy similar a ZYPLAST™, un material que ya se ha probado que se puede manipular fácilmente como un material inyectable. Tomando como base estos datos, se cree que mediante la manipulación cuidadosa de las especies vehiculares asociadas con el gel de seda, la modulación de la concentración de seda y el control del tamaño de las partículas, los materiales de gel de seda pueden prepararse para que se comporten como un material fácilmente inyectable.

Estos resultados indican que los geles de seda pueden pulverizarse hasta un intervalo de partícula de aproximadamente $25-50 \mu\text{m}^2$ de área transversal. Los geles de seda pueden pulverizarse hasta un tamaño similar a ZYPLAST™. El tamaño de las partículas del gel de seda puede disminuirse incrementando la concentración de seda o cambiando el método de pulverización. El incremento de las concentraciones de RGD no desarrolló una tendencia clara en el tamaño de las partículas de seda. Los geles de seda pueden extruirse a una tasa de deformación relevante de 50 mm/min a una fuerza comparable a o menor de ZYPLAST™. La fuerza de extrusión del gel de seda puede disminuirse añadiendo cantidades crecientes de vehículo salino o concentraciones decrecientes de seda en el gel original. Los cambios en el método de pulverización que se intentan en este estudio no influyeron sustancialmente en la cantidad de fuerza necesaria para la extrusión de la seda. El incremento de las concentraciones de RGD no desarrolló una tendencia clara en la fuerza de extrusión del gel de seda.

Ejemplo 12

Precipitados de Gel de Seda

Se generaron materiales de precipitado del gel de seda mostrados en la Tabla 10 para análisis. La disolución de seda de la concentración especificada se generó usando la disolución madre de 8% (p/v) de seda acuosa y diluyendo con agua purificada (Milli-Q purificada). Se preparó acelerante 23RGD/etanol generando una disolución de etanol y agua purificada y disolviendo la cantidad especificada de 23RGD por agitación con vórtex. Los precipitados de seda se generaron añadiendo directamente el volumen especificado de disolución de acelerante al de la disolución de seda en tubos de centrifuga de 50 mL, agitando una vez para mezclar y dejando que la mezcla permanezca 5 segundos adicionales antes de añadir aproximadamente 45 mL de agua purificada para parar el proceso de gelificación. Este material permaneció durante 24 horas en condiciones ambiente y se presionó a través de tela de acero inoxidable con poros de $150 \mu\text{m} \times 150 \mu\text{m}$ para recuperar los precipitados. Estos precipitados se lavaron dos veces durante 24 horas en 50 mL de agua purificada (Milli-Q) a condiciones ambiente, se presionaron una vez más y se usaron para evaluación.

Tabla 10. Tipos de Precipitados de Gel de Seda Generados

Nombre del Grupo	Disolución Inicial de Seda		Acelerante 23RGD/etanol			Precipitado Final	
	Concentración de Seda (mg/mL)	Volumen de Disolución de Seda (mL)	Concentración de Etanol (%)	Concentración de 23RGD (mg/mL)	Volumen de Disolución de Acelerante (mL)	Concentración Final de Seda (mg/mL)	Proporción Molar RGD: Seda
BASE	80	1	90	2,45	1	40	5,0
RHI	80	1	90	4,90	1	40	10,0
RVLO	80	1	90	0,49	1	40	1,0
RLO	80	1	90	1,47	1	40	3,0
SCLO	80	1	90	2,45	1	30	6,7
SCVLO	80	1	90	2,45	1	20	10,0

ECLO	80	1	80	2,45	1	40	5,0
ECVLO	80	1	70	2,45	1	40	5,0
AVHI	80	0,67	90	2,45	1,33	27	10,0
AVLO	80	1,33	90	2,45	0,67	53	2,5

Las muestras de gel se examinaron en condiciones de bajo vacío (~1 Torr) en un microscopio electrónico de barrido medioambiental Quanta 200 (FEI Co., Hillsboro, OR) con imágenes recogidas a aumentos de 200x. Se tomaron imágenes representativas para ilustrar las características de topografía superficial de muestras de precipitado de seda (Figura 17). Todos los tipos de precipitado de seda aparecieron similares en los análisis ESEM. Cada muestra presentó una mezcla de regiones tanto granulares como filamentosas con la aparición ocasional de masas grandes, contiguas de material liso.

Ejemplo 13

Cálculo de la Masa del Precipitado de Gel de Seda

Las muestras de precipitado de seda, como se ha descrito en el Ejemplo 12, se aislaron después de lavar por presión a través de una tela de alambre de acero inoxidable con un tamaño de poro de 104 μm x 104 μm y transferidos suavemente con una toallita limpia, sin pelusas. Se calculó la masa de las muestras con una precisión de 0,01 mg usando una balanza S-215 (Denver Instrument, Denver, CO). Estas muestras se congelaron hasta -80°C durante 24 horas y se pusieron en una unidad liofilizadora Labconco (Labconco Corp., Kansas City, MO) durante 96 horas para eliminar todo el contenido de agua. Se calculó de nuevo la masa de los sólidos residuales del precipitado y se determinó la fracción de masa seca en las muestras. Se usó un análisis de varianza de una vía (ANOVA) para ensayar las diferencias significativas causadas por el cambio en la concentración de seda, concentración de 23RGD y volumen de acelerante. Se usó un ensayo de la t de Student para ensayar la significancia de las diferencias que resultan de concentraciones alteradas de etanol.

El incremento en la concentración de fibroína de seda incrementó la masa seca del precipitado con El incremento del porcentaje de etanol en la disolución de acelerante también incrementó la masa seca de los precipitados con ECVLO produjo sólo cantidades traza de precipitado (visible pero no recuperable en cantidades mensurables).

El incremento del volumen de acelerante incrementó significativamente la masa seca del precipitado ya que AVHI fue significativamente mayor tanto que AVLO como BASE ($p \leq 0,05$, Figura 18A). Por ejemplo, AVHI ($18,02 \pm 3,9$ mg) fue significativamente mayor tanto que AVLO ($7,37 \pm 1,33$ mg) como BASE ($11,07 \pm 2,86$ mg). El incremento de las concentraciones de 23RGD en el acelerante también incrementó la masa seca del precipitado con BASE y RHI ambos significativamente mayores que RVLO a (Figura 18B). Por ejemplo, BASE a $11,07 \pm 2,86$ mg, RHI a $15,61 \pm 3,62$ mg y RMED a $10,2 \pm 1,42$ mg fueron todos significativamente mayores que RLO a $1,9 \pm 0,6$ mg. El incremento de la concentración de fibroína de seda incrementó la masa seca del precipitado con BASE siendo mayor que SCLO y significativamente mayor que SCVLO (Figura 18C). Por ejemplo, BASE fue mayor que SCLO a $7,84 \pm 1,49$ mg y significativamente mayor que SCVLO a $4,15 \pm 1,0$ mg. El incremento del porcentaje de etanol en la disolución de acelerante también incrementó la masa seca de los precipitados con BASE produciendo significativamente más que ECLO (Figura 18D). Por ejemplo, BASE produjo significativamente más que ECLO a $2,8 \pm 0,91$ mg. ECVLO produjo sólo cantidades traza de precipitado (visible, pero no recuperable en cantidades mensurables). Estos resultados indican que concentraciones mayores de reactantes (es decir, disolución de acelerante, RGD, seda y etanol) todas incrementaron la cantidad de precipitado resultante.

El porcentaje de agua en los precipitados de seda se determinó como el porcentaje de masa perdida después de que los precipitados de seda de cada tipo de formulación se sometieran a una etapa de liofilización. El incremento de la fracción volumétrica de acelerante añadido para preparar los precipitados de seda no influyó significativamente ($p \leq 0,05$) en la fracción de masa seca de los precipitados resultantes (Figura 19A). Por ejemplo, AVLO a ($85,57 \pm 2,32\%$, BASE a $88,99 \pm 0,8\%$ y AVHI fue $86,83 \pm 1,95\%$). El incremento de las concentraciones de 23RGD en el acelerante mostró un incremento significativo del porcentaje de masa seca con RVLO significativamente menor que RLO, RHI y BASE (Figura 19B). Por ejemplo, RLO a $95,01 \pm 1,76\%$ retuvo significativamente más agua que RMED a $86,52 \pm 2,67\%$, RHI a $88,39 \pm 0,98\%$ y BASE. El incremento de las concentraciones de fibroína de seda no resultó en una tendencia clara aunque SCLO fue significativamente mayor tanto que SCVLO como BASE (Figura 19C). Por ejemplo, SCLO a $80,77 \pm 1,97\%$ fue significativamente menor tanto que SCVLO a $86,94 \pm 1,98\%$ como BASE. El incremento del porcentaje de etanol en la disolución de acelerante disminuyó significativamente el porcentaje de masa seca con ECLO comparado con BASE (Figura 19D). Por ejemplo, ECLO a $86,97 \pm 1,16\%$ comparado con BASE. En resumen, las concentraciones mayores de reactantes (es decir, disolución de acelerante, 23RGD, seda y etanol) incrementaron la cantidad de precipitado

resultante. También es interesante que existieron diferencias significativas entre las fracciones de masa seca de BASE y tanto de RVLO como ECLO, indicando posiblemente diferentes estructuras proteicas. Estas estructuras proteicas diferentes podrían ser más hidrofóbicas que BASE en el caso de ECLO y más hidrofílicas en el caso de RVLO. Estas propiedades podrían usarse para influir en la estabilidad de los geles en un entorno in vivo siendo los materiales más hidrofílicos más fácilmente bioresorbidos por el huésped mientras que los materiales más hidrofóbicos son más resistentes.

En el examen del porcentaje de agua en los precipitados es particularmente interesante que existieron diferencias significativas entre BASE y tanto RLO como ECLO. Esto puede resultar de restos estructurales diferentes que otros tipos de precipitados generados por RLO y ECLO. Respecto a ECLO, tiene una mayor proporción de estructura de lámina β que BASE y se esperaría que atrapa menos agua. Sin embargo, la diferencia observada entre RLO y base es difícil de explicar. RLO tiene un grado mayor de estructura de lámina β con menos restos de hélice α y espiral al azar que BASE, y aún así atrapa una mayor cantidad de agua. De hecho, esta misma tendencia se observa cuando se compara RLO con RMED, BASE y RHI. La situación es más confusa examinando la relación entre las estructuras secundarias iniciales de RMED, BASE y RHI, ya que todas presentan inicialmente mayores cantidades de hélice α y espiral al azar que RLO, y aún así atrapan significativamente menos agua. Las muestras de SCLO también tuvieron un porcentaje de masa seca significativamente mayor comparado con muestras BASE y SCVLO sin tendencia clara o razón para este hecho. Estos datos indican que puede existir una diferencia estructural en estos precipitados no aparente en la estructura secundaria de los materiales que está influyendo en la manera en la que los precipitados se asocian con agua. Puede ser el caso de que el RGD unido a estos precipitados tenga alterada de alguna manera la manera en la que las moléculas de seda se presentan al agua, aumentando su capacidad para asociarse con ésta.

Ejemplo 14

Captura del Espectro FTIR del Precipitado de Gel

Los precipitados de gel de cada tipo, como se ha descrito en el Ejemplo 12, se analizaron por espectroscopia de infrarrojo con transformada de Fourier con reflectancia total atenuada (ATR-FTIR) usando un espectrofotómetro Bruker Equinox 55 (Bruker Optics, Inc., Billerica, MA) acoplado con un cristal de germanio Pike MIRACLE™ (PIKE Technologies, Madison, WI). Los espectros de señal ATR de las muestras se obtuvieron realizando una integración de 128 escaneos. La resolución se ajustó a 4 cm^{-1} con un intervalo de 1 cm^{-1} de un intervalo de 4.000 a 400 cm^{-1} . Los espectros FTIR de agua pura también se recogieron y restaron manualmente de los espectros del gel para eliminar la señal de agua de confusión a una proporción conducente al aplanamiento de la región entre 1.800 cm^{-1} y 1.700 cm^{-1} en el espectro. Después de la resta, las bandas Amida I (1.700 - 1.600 cm^{-1}) de los espectros representativos se evaluaron frente a los picos característicos que se acepta comúnmente que están asociados con estructuras secundarias proteicas.

El examen de los precipitados de seda bajo FTIR reveló que el incremento de la proporción volumétrica de acelerante añadido a la disolución de seda tenía un efecto pequeño en su estructura secundaria proteica (Figura 20A). AVLO, BASE y AVHI todos presentaron características similares con picos característicos alrededor de 1.624 cm^{-1} y una región toe a 1.698 cm^{-1} lo que indica una predominancia de estructura de lámina β y giro β respectivamente. Cada muestra también presentó estructuras adicionales a 1.677 cm^{-1} , 1.663 cm^{-1} , 1.654 cm^{-1} y 1.645 cm^{-1} indicando conformaciones intercaladas adicionales de lámina β , giro β , hélice α y espiral al azar, respectivamente. El incremento de las concentraciones de 23RGD en el acelerante disminuyó la estabilidad de la lámina β indicada por un desplazamiento del pico de $\sim 1.621\text{ cm}^{-1}$ en RVLO a $\sim 1.624\text{ cm}^{-1}$ en RLO (Figura 20B). El incremento adicional de la concentración de 23RGD en BASE y RHI causó de nuevo esta lámina β debilitada acompañado de un incremento en los valores de la señal mayores en los intervalos 1.654 cm^{-1} y 1.645 cm^{-1} , indicando constituyentes de espiral al azar y hélice α incrementados. Por lo demás, RVLO, RLO, BASE y RHI revelaron estructuras similares con picos dominantes en el intervalo 1.620 cm^{-1} y una región toe a 1.698 cm^{-1} con estructuras adicionales a 1.654 cm^{-1} y 1.645 cm^{-1} . El incremento de las concentraciones de fibroína de seda tuvo un efecto poco perceptible en la estructura secundaria proteica (Figura 20C). Los espectros para SCVLO, SCLO y BASE cada uno presentó picos característicos similares alrededor de 1.624 cm^{-1} con regiones toe a 1.698 cm^{-1} , lo que indica una estructura de lámina β predominante con conformaciones intercaladas adicionales de hélice α y espiral al azar. El incremento del porcentaje de etanol en la disolución de acelerante resultó en una menor evidencia de conformaciones de hélice α y espiral al azar indicado por una disminución en la señal entre 1.670 cm^{-1} y 1.630 cm^{-1} tanto en las muestras ECLO como BASE respecto a ECVLO (Figura 20D). Esta disminución en hélice α y espiral al azar se acompaña por un incremento en estructura de lámina β .

Existió una similitud sustancial entre todos los grupos excepto para RVLO y ECVLO, que se diferenciaron cada uno de la formulación BASE. Cada uno de estos tipos de materiales presentó una estructura secundaria diferente tanto entre sí como de BASE, reforzando la tendencia observada previamente en el porcentaje de masa seca de los precipitados. Las concentraciones mayores de 23RGD rindieron estructuras de lámina β menos organizadas y menores concentraciones de etanol rindieron mayores cantidades de restos de hélice α y espiral al azar. Es posible que usados conjuntamente uno

con el otro, estos dos fenómenos podrían ajustarse para desarrollar estructuras de seda que resultan de disoluciones de seda en cualquiera de una variedad de diferentes conformaciones proteicas. Estas conformaciones podrían, a su vez, personalizarse tomando como base las propiedades brutas finales deseadas del material de seda.

5 Se espera que los componentes de lámina β mayores podrían proporcionar al gel una mayor resistencia a la bioresorción y carga compresiva, mientras que al mismo tiempo, hacen que el material sea más rígido.

Ejemplo 15

Tinción con Rojo Congo de los Precipitados de Gel

10 Las muestras de precipitado de seda se tiñeron con 100 μ M de rojo Congo en agua purificada. Las muestras de precipitado de seda que pesaban 5-10 mg se agitaron con vórtex con 500 μ L de esta disolución durante 15 segundos, se dejó permanecer a temperatura ambiente (\sim 20-24°C) durante 10 minutos y se centrifugó a 16.000 g (RCF) durante 10 minutos. El sobrenadante se desechó y el sedimento se resuspendió agitando con vórtex durante 30 segundos en 1 mL de agua purificada. El proceso de empapado, centrifugación, aspiración y lavado se repitió 3 veces. El sedimento final se quitó, se frotó en un portaobjetos de microscopio de vidrio y se obtuvieron imágenes bajo luz blanca y polarizada usando una Cámara Microscope PC MACROFIRE™ Modelo S99831 (Optronics, Goleta, CA) y software PICTUREFRAME™ 2.1 (Optronics, Goleta, CA) y un System Microscope Modelo BX41 (Olympus, Melville, NY).

15 Ninguno de los tipos de precipitado de seda presentó la luminiscencia esmeralda asociada típicamente con estructuras fibrilares amiloides (Figura 21). Todos los tipos de precipitado presentaron una luminiscencia blanca brillante, indicativa de una estructura cristalina robusta. El grado de esta luminosidad no parece variar sustancialmente con la formulación, sino sólo con la cantidad de muestra en el portaobjetos. Tomando como base estos resultados, es improbable que ninguno de estos tipos de precipitado tenga naturaleza amiloide, un signo positivo, ya que las fibrillas amiloides están asociadas con varias patologías negativas en los seres humanos.

Ejemplo 16

Cuantificación de 23RGD en los Precipitados de Gel por HPLC

25 La cantidad de 23RGD unido a los precipitados de seda se cuantificó analizando muestras liofilizadas. El 23RGD se eliminó incubando las muestras durante 4 horas en un tampón de disolución, centrifugando en un Eppendorf 5415C (Eppendorf North America Inc., Westbury, NY) a 16.000 g (RCF) durante 30 minutos y el sobrenadante se recogió. Este sobrenadante se centrifugó de una manera idéntica y el sobrenadante final se recogió para análisis por HPLC usando un PerkinElmer Serie 200 (PerkinElmer, Waltham, MA). Las áreas de los picos de 23RGD de cada curva se compararon frente a una curva estándar. Se usó ANOVA de 1 vía para ensayar las diferencias significativas causadas por el cambio de la concentración de seda, concentración de 23RGD y volumen de acelerante. Se usó un ensayo de la t de Student para ensayar la significancia de las diferencias que resultan de concentraciones de etanol alteradas.

30 El incremento de la cantidad de acelerante 23RGD/etanol añadido resultó en un incremento significativo ($p \leq 0,05$) en la proporción 23RGD:seda tanto para BASE como AVHI comparado con AVLO (Figura 22A). Por ejemplo, BASE a $8,7 \pm 0,6$ y AVHI a $10,5 \pm 1,2$ se incrementaron significativamente comparados con AVLO a $5,2 \pm 1,8$. El incremento de la cantidad de 23RGD en la disolución de acelerante resultó en incrementos significativos en la proporción 23RGD:seda para cada uno de RVLO, RLO, BASE y RHI uno respecto al otro (Figura 22B). Por ejemplo, RLO a $1,1 \pm 0,2$, RMED a $6,95 \pm 0,49$, BASE y RHI a $10,7 \pm 0,8$ uno respecto al otro. El cambio de la concentración de partida de seda en la disolución antes de la precipitación no afectó la proporción 23RGD:seda ya que los de SCVLO, SCLO y BASE no se diferenciaron significativamente (Figura 22C). Por ejemplo, SCVLO a $11,0 \pm 0,4$, SCLO a $9,9 \pm 1,8$ y BASE no se diferenciaron significativamente. La disminución del contenido de etanol en el acelerante no produjo un efecto significativo como se observa comparando ECLO y BASE (Figura 22D).

35 La revisión de estos datos a la luz de los datos del cálculo de masa seca de los precipitados, ninguna de las condiciones exploradas resultó en aislamiento de seda (\sim 10-35% precipitada) ni 23RGD (\sim 5-30% precipitado) como reactivos limitantes en la reacción. Las muestras de precipitado generadas a una proporción calculada 10:1 de 23RGD:seda generaron de manera consistente una proporción de unión molecular "correcta". En el caso de AVHI, esto es contrario a la tendencia de que las concentraciones de 23RGD unido sean aproximadamente el doble de los valores proyectados como se indica por AVLO y BASE (aproximadamente 5:1 y aproximadamente 9:1, respectivamente). Esto podría explicarse por la saturación de la seda con 23RGD en el caso de precipitados 10:1 23RGD. Esto se ve reforzado adicionalmente por el comportamiento de SCVLO y 0,6S 3R 10:1, ambos de los cuales se produjeron usando 2,45 mg/mL de 23RGD en etanol al 90% como lo fue AVHI. Se postuló que ambos materiales tienen mayores proporciones que 10:1 de 23RGD unido (20:1 y 13,4:1, respectivamente) tomando como base el comportamiento de AVLO y BASE, pero que ambos alcanzaron sólo proporciones de aproximadamente 10:1. RHI, generado usando una concentración de

23RGD de 4,5 mg/mL en el acelerante que debería haber sido posiblemente lo suficientemente alta para inducir el 23RGD dimérico postulado sólo alcanzó la proporción esperada de 23RGD de aproximadamente 10:1 no la postulada 20:1.

5 Unos pocos de los precipitados de seda atraparon una proporción molar similar a la que se calculó inicialmente (Figura 23). Cuatro grupos, SCVLO, AVHI, RHI y RLO contenían proporciones similares a sus valores calculados de RGD por mol de seda. Los seis grupos restantes contenían proporciones sustancialmente mayores de sus valores calculados. En los casos de AVLO, BASE, RMED y SCLO, las cantidades de RGD fueron aproximadamente 2 veces mayores que las esperadas. Aunque no se pretende la limitación por teoría, esta proporción molar mayor observada puede ser indicativa de la formación de una bicapa de RGD. Puede ser el caso de que existieran bien micelas o estructuras lamelares de RGD en la disolución de etanol al 90% antes de la adición a la seda, después del contacto con la fase acuosa, la estabilidad micelar se alteró. Como resultado, se formó una bicapa de RGD en la interfase de la disolución, en la que estas moléculas empezaron a interactuar con las moléculas de seda. Las muestras RLO se prepararon con una concentración de RGD de 0,49 mg/mL en el acelerante, la más baja de las usadas en este estudio y potencialmente en el intervalo de solubilidad de RGD en etanol al 90%. Las muestras RMED usaron 1,47 mg/mL y la mayor parte de las demás formulaciones se prepararon con una concentración de acelerante RGD de 2,45 mg/mL, por encima de la concentración de RGD a la que la dimerización era favorable en la disolución. Lo que indica adicionalmente la posibilidad de la dimerización de RGD en la disolución de etanol es el comportamiento de la precipitación de ECLO. La concentración de RGD permanece a 2,45 mg/mL como con BASE y AVLO pero la concentración de agua en el acelerante se incrementa hasta el 20% y resulta en una unión de aproximadamente 1,5 veces la total esperada de RGD. Esto puede deberse a una fuerza directora disminuida para la formación de la bicapa de RGD en la interfase de la disolución causada por el menor contenido de etanol. Esto, a su vez, podría causar la alteración de menos estructuras micelares en la disolución inicial de acelerante. También podría explicarse por una estructura micelar alterada, variando entre una única capa peptídica y una estructura multi-lamelar dependiendo de las concentraciones de agua y etanol en la fase de acelerante.

25 Las muestras de precipitado generadas a una proporción calculada 10:1 de RGD:seda generaron de manera consistente una proporción de unión molecular "correcta". En el caso de AVHI, esto es contrario a la tendencia de que las concentraciones de RGD unido sean aproximadamente el doble de los valores proyectados como se indica por AVLO y BASE (aproximadamente 5:1 y aproximadamente 9:1 respectivamente). Es posible que esto pueda explicarse por la saturación de la seda con RGD en el caso de los precipitados 10:1 de RGD. Esto se ve reforzado adicionalmente por el comportamiento de SCVLO y 0,6S 3R 10:1, ambos de los cuales se produjeron usando 2,45 mg/mL de RGD en etanol al 90% como lo fue AVHI. Se pronosticó que ambos materiales tenían proporciones mayores de 10:1 de RGD unido (20:1 y 13,4:1 respectivamente) tomando como base el comportamiento de AVLO y BASE, pero ambos sólo alcanzaron proporciones de aproximadamente 10:1. RHI, generado usando una concentración de RGD de 4,5 mg/mL en el acelerante que posiblemente debería haber sido lo suficientemente alta para inducir el RGD dimérico postulado, sólo alcanzó la proporción esperada de RGD de aproximadamente 10:1 no la postulada 20:1. Esto puede atribuirse al modo de unión entre las moléculas de seda y las moléculas de RGD. Se espera que RGD se unirá mediante un mecanismo de asociación hidrofóbica y a pesar de la secuencia muy hidrofóbica de la seda, puede ser posible que existan aproximadamente 5 sitios que ofrezcan estabilidad de unión a RGD preferible. Esta presunción surge de la aparente saturación a 10:1 moléculas de RGD por molécula de seda. Dependiendo de la naturaleza de la auto-asociación de RGD en el límite de la disolución, puede existir un caso en el que moléculas únicas de RGD o dímeros de RGD se unan a estos sitios.

45 Existe una serie de propiedades que indican adicionalmente la posibilidad de una interacción de ensamblaje molecular específica entre la seda y el acelerante 23RGD. Notablemente, que 23RGD se localice en los precipitados en una proporción mayor de la calculada pero que se una a concentraciones intuitivas que pueden relacionarse rápidamente con las proporciones molares calculadas inicialmente. El hecho de que esto ocurra sin agotar totalmente las moléculas de 23RGD o las moléculas de fibroína de seda presenta un interés adicional. Los datos de FTIR también indicaron que el uso de 0,49 mg/mL de 23RGD en precipitados RVLO inducía la formación de estructuras claramente diferentes que el uso de 2,45 mg/mL en BASE ó 4,9 mg/mL en RHI, que parecieron similares entre sí. Los precipitados RMED generados con 1,47 mg/mL de 23RGD contenían características de los espectros tanto de material RVLO como BASE/RHI. FTIR indicó una estructura diferente de acelerante 2,45 mg/mL de 23RGD en etanol al 70% en el caso de ECVLO. Estos resultados se vieron ambos reforzados por el examen del porcentaje de masa seca de los precipitados resultantes (aunque ECLO se usa para ilustrar la tendencia de la solubilidad de 23RGD en la disolución de etanol en lugar de ECVLO). Estos dos ensayos indican la formación de diferentes estructuras en el precipitado tomando como base el grado de saturación de 23RGD en la disolución de etanol, que resulta posiblemente de la unión de 23RGD dimérico o la unión de 23RGD monomérico.

Este fenómeno resulta probablemente de la naturaleza anfílica de 23RGD y la química variada de la fase de disolución entre altamente etanólica y altamente acuosa. Es posible que los extremos hidrofílicos de dos moléculas de 23RGD se asocien en la disolución de etanol al 90%, exponiendo los dos extremos hidrofóbicos a la disolución. La adición de esta

- disolución de acelerante con 23RGD dimérico causa la rápida asociación de los extremos hidrofóbicos expuestos del 23RGD con dominios hidrofóbicos de las moléculas de seda, precipitándolos rápidamente. Este proceso ocurre hasta que la disolución de acelerante de etanol al 90% está lo suficientemente diluida con la disolución acuosa de seda como para causar que ya no sea favorable el ensamblaje dimérico de las moléculas de 23RGD y como resultado se para la precipitación. Tomando como base la saturación aparente a aproximadamente 10 para proporción 23RGD:seda, también puede haber un máximo de 5 sitios de unión para el dímero de 23RGD por molécula de seda. Este conocimiento puede usarse para unir cantidades específicas de 23RGD a seda, mientras que al mismo tiempo se dicta la estructura del gel de seda y el comportamiento resultante. Además, este método también puede aplicarse potencialmente a otros péptidos anfílicos de interés durante su integración en un material de gel de seda.
- Estos resultados indican que la cantidad de precipitado de seda puede incrementarse incrementando la cantidad de cualquier reactante en el sistema RGDEEG. No es probable que los precipitados de seda que se producen durante la gelificación RGDEEG sean amiloides. La estructura de lámina β del precipitado de seda puede incrementarse por mayores concentraciones de acelerante etanol o menores concentraciones de RGD. Las moléculas de RGD pueden auto-asociarse en micelas, estructuras lamelares o dímeros cuando se ponen en una disolución fuertemente etanólica, a su vez, ensamblándose con seda en una forma dimérica durante la gelificación RGDEEG. Las moléculas de seda pueden saturarse con RGD una vez que han unido aproximadamente 10 moléculas. Las estructuras de los precipitados de seda pueden alterarse cambiando las concentraciones de RGD añadidas, aunque el grado y la naturaleza de estos cambios permanece sin aclararse, ya que no son perceptibles en la estructura secundaria del material. Estas estructuras alteradas pueden ser responsables de la apariencia incrementada, de otra forma inexplicada, de restos de hélice α y espiral al azar a altas concentraciones de RGD en los precipitados. Estas estructuras alteradas pueden ser responsables de la resistencia incrementada, de otra forma inexplicada, para la bioresorción proteolítica de los restos de hélice α y espiral al azar a altas concentraciones de RGD en los precipitados.

Ejemplo 17

Bioresorción Enzimática de los Precipitados de Gel

- Se calculó la masa de una única muestra de los tipos de precipitado seleccionada para comportamiento claramente diferente de BASE en los ensayos previamente listados incluyendo RVLO, RLO, BASE, RHI, ECLO, 0,6S 3R 5:1 pesando aproximadamente 60 mg usando una balanza S-215. Estas muestras se pusieron en una disolución de Proteasa Tipo XIV de *Streptomyces griseus* (Sigma no. de catálogo P-5147) en salino tamponado con fosfato (PBS) se generó a una concentración de 0,3 mg/mL (la actividad fue 4,5 U/mg) a una proporción de 1 mL de disolución de proteasa por 100 mg de precipitado de seda. El gel y la disolución de proteasa se incubaron durante 24 horas a 37°C sin mezclado mecánico. Después de 24 horas, el precipitado residual se aisló por presión a través de una tela de acero inoxidable como anteriormente y las muestras se analizaron por FTIR como se ha descrito.

- La cantidad de acelerante añadida no afectó sustancialmente el comportamiento de bioresorción de los materiales ya que BASE, AVHI y AVLO todos presentaron niveles disminuidos de restos de hélice α y espiral al azar (Figura 23A). Esta disminución fue ligeramente mayor en el caso de AVLO que también presentó un desplazamiento de pico desde 1.624 cm^{-1} a 1.622 cm^{-1} , lo que indica una estructura de lámina β más estable. La concentración de 23RGD tampoco pareció afectar el comportamiento de bioresorción de los materiales ya que RVLO, RLO, BASE y RHI mostraron todos una disminución en los restos de hélice α y espiral al azar, aunque una mayor parte de hélice α y espiral al azar permaneció intacta en RHI (Figura 23B). Sin embargo, una mayor parte de hélice α y espiral al azar permaneció intacta en RHI en Día 2 respecto a las demás muestras. La concentración de seda no afectó sustancialmente el comportamiento de bioresorción de los materiales ya que BASE y SCLO presentaron niveles disminuidos de restos de hélice α y espiral al azar y presentaron desplazamientos de pico ligeros desde 1.624 cm^{-1} a 1.623 cm^{-1} (Figura 23C).

- A pesar de las diferencias en las estructuras iniciales, todos los tipos de precipitado se bioresorbieron de una forma similar con los restos de hélice α y espiral al azar degradados preferentemente a lámina β . Sólo el incremento de la concentración de 23RGD, como en el caso de RHI, pareció tener un efecto apreciable en la estructura secundaria final de los precipitados. Éste parece ser un caso en el que hay simplemente más estructura de hélice α y espiral al azar después de la formación inicial de estos materiales y tardan más tiempo en degradarse hasta un grado similar de estructura de lámina β que las demás formulaciones. El uso de este conocimiento conjuntamente con una capacidad para manipular las estructuras secundarias proteicas de estos materiales podría dar lugar a biomateriales con vidas útiles *in vivo* muy específicas.

LISTADO DE SECUENCIAS

- <110> Allergan, Inc.
- 5 Altman, Gregory H.
 Horan, Rebecca L.
 Collette, Adam L.
 Chen, Jing Song
 Van Epps, Dennis
- 10 <120> Hidrogeles de Fibroína de Seda y Usos de Éstos
 <130> 18705 PCT-2 (SER)
 <150> US 61/170895
 <151> 2009-04-20
 <160> 29
- 15 <170> PatentIn versión 3.5
 <210> 1
 <211> 23
 <212> PRT
 <213> Secuencia
- 20 <400> 1
 Gly Arg Gly Asp Ile Pro Ala Ser Ser Lys Gly Gly Gly Gly Ser Arg
 1 5 10 15
 Leu Leu Leu Leu Leu Leu Arg
 20
- 25 <210> 2
 <211> 23
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
- 30 <223> Péptido RGD acilado
 <220>
 <221> MOD_RES
 <222> (1)..(1)
 <223> ACETILACIÓN

<220>
 <221> MOD_RES
 <222> (2)..(2)
 <223> Forma D
 5 <220>
 <221> MOD_RES
 <222> (16)..(16)
 <223> Forma D
 <220>
 10 <221> MOD_RES
 <222> (23)..(23)
 <223> Forma D
 <400> 2

 15 Gly Arg Gly Asp Ile Pro Ala Ser Ser Lys Gly Gly Gly Gly Ser Arg
 1 5 10 15
 Leu Leu Leu Leu Leu Leu Arg
 20
 <210> 3
 20 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> Péptido espaciador SGGGGKSSAP
 25 <400> 3
 Ser Gly Gly Gly Gly Lys Ser Ser Ala Pro
 1 5 10
 <210> 4
 <211> 6
 30 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> Dominio hidrofílico
 <400> 4

Lys Gln Ala Gly Asp Val
 1 5
 <210> 5
 5 <211> 5
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> Dominio hidrofílico
 10 <400> 5
 Pro His Ser Arg Asn
 1 5
 <210> 6
 <211> 5
 15 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> Dominio hidrofílico YIGSR
 <400> 6
 20 Tyr Ile Gly Ser Arg
 1 5
 <210> 7
 <211> 9
 <212> PRT
 25 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> Dominio hidrofílico CDPGYIGSR
 <400> 7
 Cys Asp Pro Gly Tyr Ile Gly Ser Arg
 30 1 5
 <210> 8
 <211> 5
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

<220>
 <223> Dominio hidrofílico IKVAV
 <400> 8
 Ile Lys Val Ala Val
 5 1 5
 <210> 9
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

10 <220>
 <223> Dominio hidrofílico RNIAEIKDI
 <400> 9
 Arg Asn Ile Ala Glu Ile Ile Lys Asp Ile
 1 5 10
 15 <210> 10
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

20 <220>
 <223> Dominio hidrofílico YFQRYLI
 <400> 10
 Tyr Phe Gln Arg Tyr Leu Ile
 1 5
 <210> 11
 25 <211> 5
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

30 <220>
 <223> Dominio hidrofílico PDSGR
 <400> 11
 Pro Asp Ser Gly Arg
 1 5
 <210> 12
 <211> 7

<212> PRT
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> Dominio hidrofílico FHRRKA
 5 <400> 12
 Phe His Arg Arg Ile Lys Ala
 1 5
 <210> 13
 <211> 6
 10 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> Dominio hidrofílico PRRARV
 <400> 13
 15 Pro Arg Arg Ala Arg Val
 1 5
 <210> 14
 <211> 8
 <212> PRT
 20 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> Dominio hidrofílico WQPPRARI
 <400> 14
 Trp Gln Pro Pro Arg Ala Arg Ile
 25 1 5
 <210> 15
 <211> 5
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial
 30 <220>
 <223> Cola hidrofóbica/apolar LLLLL
 <400> 15
 Leu Leu Leu Leu Leu
 1 5

<210> 16
 <211> 5
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial
 5 <220>
 <223> Cola hidrofóbica/apolar LLFFL
 <400> 16
 Leu Leu Phe Phe Leu
 1 5
 10 <210> 17
 <211> 5
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 15 <223> Cola hidrofóbica/apolar LFLWL
 <400> 17
 Leu Phe Leu Trp Leu
 1 5
 <210> 18
 20 <211> 5
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> Cola hidrofóbica/apolar FLWLL
 25 <400> 18
 Phe Leu Trp Leu Leu
 1 5
 <210> 19
 <211> 5
 30 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> Cola hidrofóbica/apolar LALGL

<400> 19
 Leu Ala Leu Gly Leu
 1 5
 <210> 20
 5 <211> 6
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> Cola hidrofóbica/apolar LLLLLL
 10 <400> 20
 Leu Leu Leu Leu Leu Leu
 1 5
 <210> 21
 <211> 7
 15 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> Cola hidrofóbica/apolar RLLLLLR
 <400> 21
 20 Arg Leu Leu Leu Leu Leu Arg
 1 5
 <210> 22
 <211> 7
 <212> PRT
 25 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> Cola hidrofóbica/apolar KLLLLLR
 <400> 22
 Lys Leu Leu Leu Leu Leu Arg
 30 1 5
 <210> 23
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Cola hidrofóbica/apolar KLLLLLK

<400> 23

Lys Leu Leu Leu Leu Lys

5 1 5

<210> 24

<211> 14

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

10 <220>

<223> Espaciador GSPGISGGGGILE

<400> 24

Gly Ser Pro Gly Ile Ser Gly Gly Gly Gly Ile Leu Glu

1 5 10

15 <210> 25

<211> 11

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

20 <223> Espaciador SGGGKSSAPI

<400> 25

Ser Gly Gly Gly Lys Ser Ser Ala Pro Ile

1 5 10

<210> 26

25 <211> 21

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Péptido cola espaciador GSPGISGGGGILEKLLLLLK

30 <400> 26

Gly Ser Pro Gly Ile Ser Gly Gly Gly Gly Ile Leu Glu Lys Leu

1 5 10 15

Leu Leu Leu Lys

20

<210> 27
 <211> 22
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial
 5 <220>
 <223> Péptido cola espaciador GSPGISGGGGGILEKLALWLLR
 <400> 27
 Gly Ser Pro Gly Ile Ser Gly Gly Gly Gly Gly Ile Leu Glu Lys Leu
 1 5 10 15
 10 Ala Leu Trp Leu Leu Arg
 20
 <210> 28
 <211> 20
 <212> PRT
 15 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> Péptido cola espaciador GSPGISGGGGGILERLLLLR
 <400> 28
 Gly Ser Pro Gly Ile Ser Gly Gly Gly Gly Gly Ile Leu Glu Arg Leu
 20 1 5 10 15
 Leu Leu Leu Arg
 20
 <210> 29
 <211> 21
 25 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> Péptido cola espaciador GSPGISGGGGGILERLLWLLR
 <400> 29
 30 Gly Ser Pro Gly Ile Ser Gly Gly Gly Gly Gly Ile Leu Glu Arg Leu
 1 5 10 15
 Leu Trp Leu Leu Arg
 20

REVINDICACIONES

1. Una formulación de hidrogel de fibroína de seda en la que la formulación comprende:
 - a) una fase de gel, incluyendo la fase de gel partículas de hidrogel que comprenden una fibroína de seda sustancialmente desprovista de sericina y un péptido anfílico; y
 - 5 b) una fase vehicular

para uso en un método de reconstrucción o aumento de tejido blando, comprendiendo el método la etapa de administrar la formulación a una región de tejido blando de un individuo que necesita reconstrucción o aumento de tejido blando.
2. La formulación para el uso de la reivindicación 1, en la que las partículas de hidrogel comprenden 1% (p/v) a 10% (p/v) de una fibroína de seda.
- 10 3. La formulación para el uso de la reivindicación 1, en la que el péptido anfílico comprende un resto RGD.
4. La formulación para el uso de la reivindicación 3, en la que el péptido anfílico es 23 RGD.
5. La formulación para el uso de la reivindicación 1, en la que el péptido anfílico comprende una región de cola, seguida de una región espaciadora y finalmente un resto RGD.
6. La formulación para el uso de la reivindicación 1, en la que las partículas de hidrogel comprenden una proporción molar de 1:10 a 10:1 moles del péptido anfílico por mol de la fibroína de seda.
- 15 7. La formulación para el uso de la reivindicación 6, en la que las partículas de hidrogel comprenden una proporción molar de 3:1 moles del péptido anfílico por mol de la fibroína de seda.
8. La formulación para el uso de la reivindicación 1, en la que las partículas de hidrogel comprenden una estructura proteica que tiene una conformación de lámina β de al menos 80%.
- 20 9. La formulación para el uso de la reivindicación 1, en la que las partículas de hidrogel comprenden una estructura proteica que tiene una conformación de lámina β de al menos 50%.
10. La formulación para el uso de la reivindicación 1, en la que las partículas de hidrogel comprenden una estructura proteica que tiene una conformación de lámina β de al menos 20%.
11. La formulación para el uso de la reivindicación 1, en la que las partículas de hidrogel comprenden una estructura proteica que tiene una conformación de hélice α y espiral al azar como máximo del 20%.
- 25 12. La formulación para el uso de la reivindicación 1, en la que las partículas de hidrogel tienen un área transversal de $5 \mu\text{m}^2$ a $1.000 \mu\text{m}^2$.
13. La formulación para el uso de la reivindicación 1, en la que las partículas de hidrogel tienen un área transversal de $20 \mu\text{m}^2$ a $50 \mu\text{m}^2$.
- 30 14. La formulación para el uso de la reivindicación 1, en la que la fase vehicular comprende salino.
15. La formulación para el uso de la reivindicación 1, en la que la fase vehicular comprende una disolución de tensioactivo.
16. La formulación para el uso de la reivindicación 1, en la que la fase de gel es 50% a 99% del volumen total de la formulación, siendo el resto una disolución vehicular.
- 35 17. La formulación para el uso de la reivindicación 1, en la que la fase de gel es aproximadamente 75% del volumen total de la formulación, siendo el resto una disolución vehicular.
18. La formulación para el uso de la reivindicación 16, en la que la formulación de hidrogel comprende además lidocaína.
19. La formulación para el uso de la reivindicación 1, en la que una molécula sintética que tiene la fórmula: (molécula X)_n (péptido espaciador)₀₋₃₀₀-(cola peptídica de cinco aminoácidos) se conjuga con la fibroína de seda.
- 40 20. La formulación para el uso de la reivindicación 1, en la que las partículas de hidrogel comprenden un componente celular.
21. La formulación para el uso de la reivindicación 20, en la que el componente celular comprende células madre.

22. La formulación para el uso de la reivindicación 20, en la que el componente celular comprende células adiposas.
23. La formulación para el uso de la reivindicación 20, en la que el componente celular comprende células madre y células adiposas.
24. La formulación para el uso de la reivindicación 1, en la que la región de tejido blando es tejido de mama.
- 5 25. Una formulación de hidrogel de fibroína de seda para uso en un método de reconstrucción de tejido blando, en la que la formulación comprende
- i) una fase de gel, incluyendo la fase de gel partículas de hidrogel que comprenden una fibroína de seda sustancialmente desprovista de sericina y un péptido anfílico; y
 - ii) una fase vehicular,
- 10 comprendiendo el método las etapas de
- a) situar un dispositivo médico implantable en un individuo en la localización deseada;
 - b) expandir el dispositivo poniendo una formulación de hidrogel de fibroína de seda en el dispositivo.
26. Una formulación de hidrogel de fibroína de seda para uso en un método de reconstrucción o aumento de mama, en la que la formulación comprende
- 15 a) una fase de gel, incluyendo la fase de gel partículas de hidrogel que comprenden una fibroína de seda sustancialmente desprovista de sericina y un péptido anfílico; y
- b) una fase vehicular,
- comprendiendo el método la etapa de la administración subdérmica de una formulación de hidrogel de fibroína de seda a una mama de un individuo que necesita reconstrucción o aumento de mama.
- 20

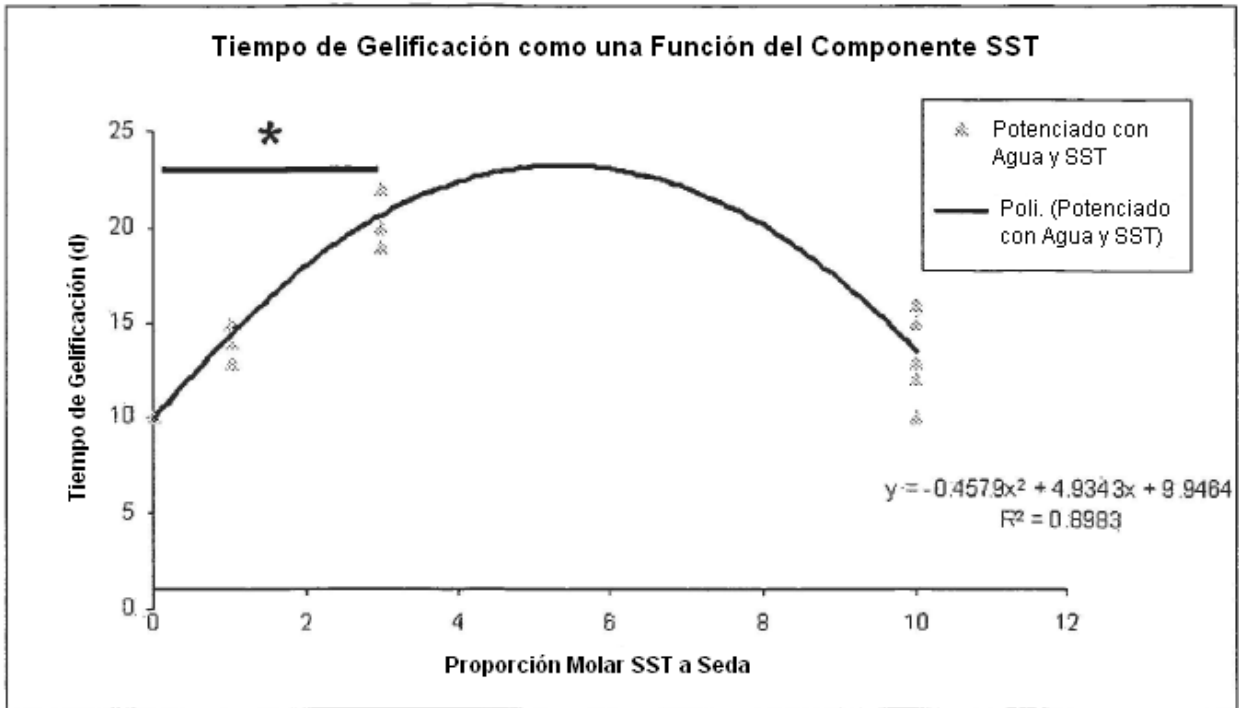


Figura 1A

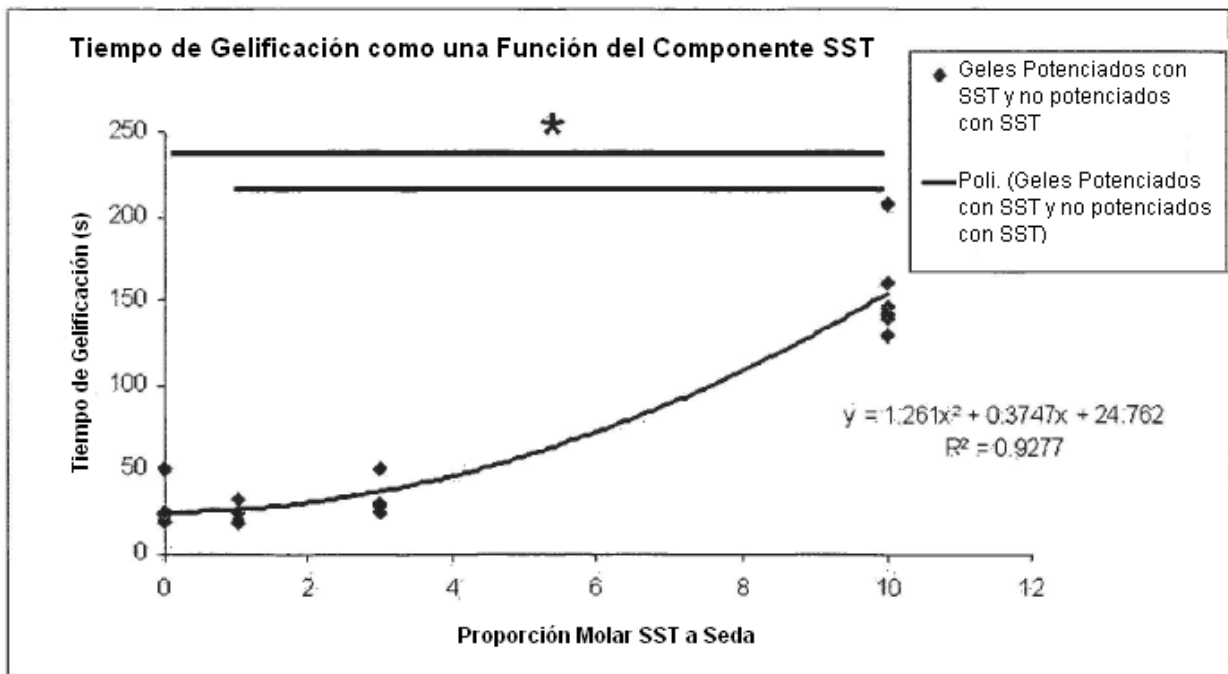


Figura 1B

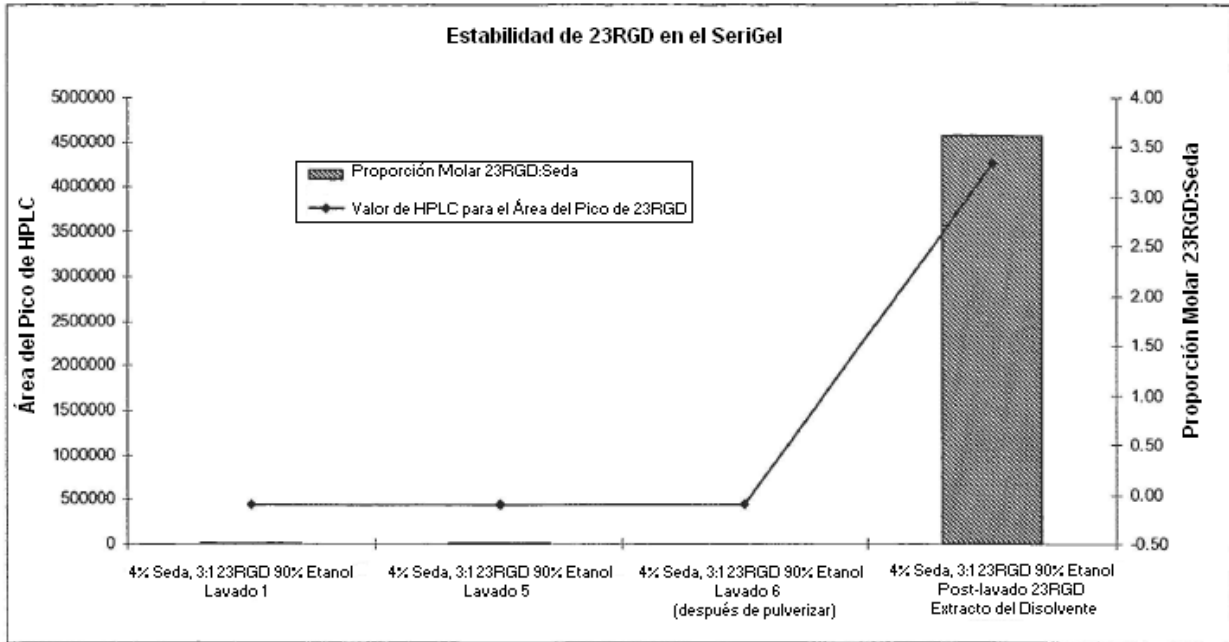


Figura 2

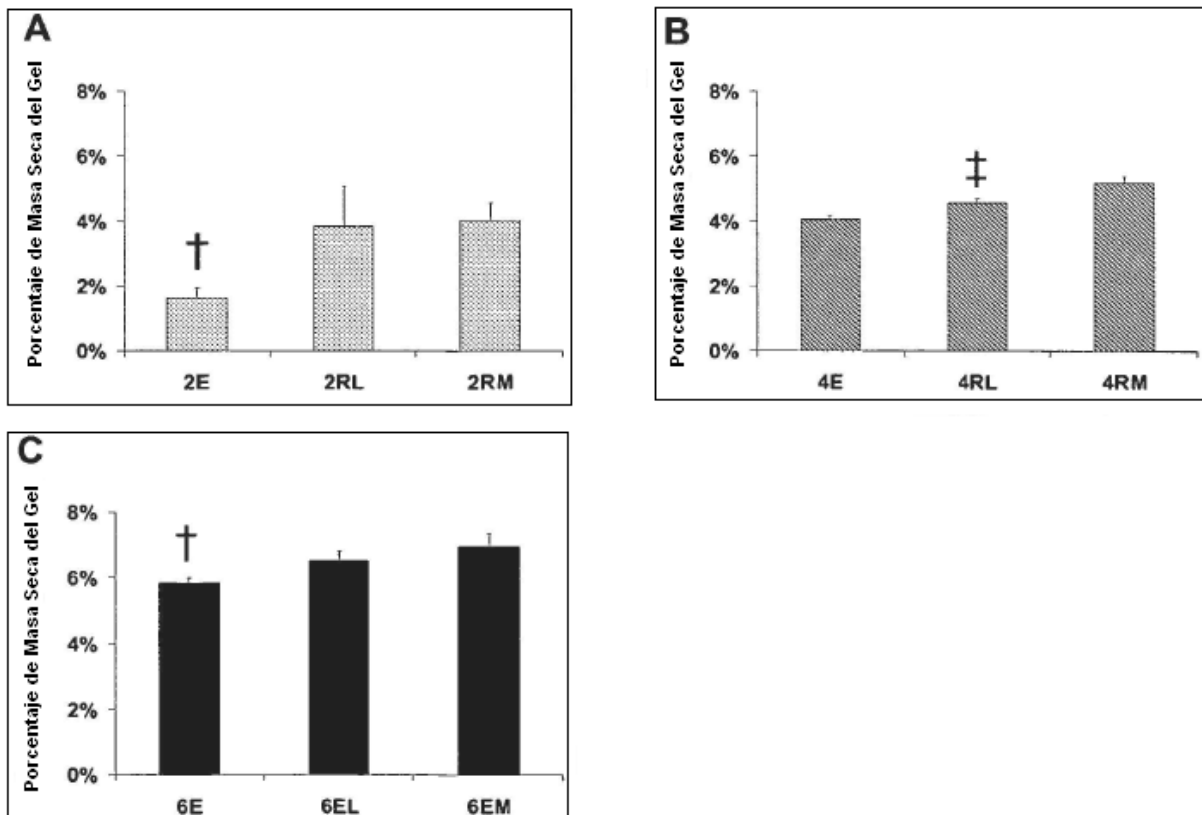


Figura 3

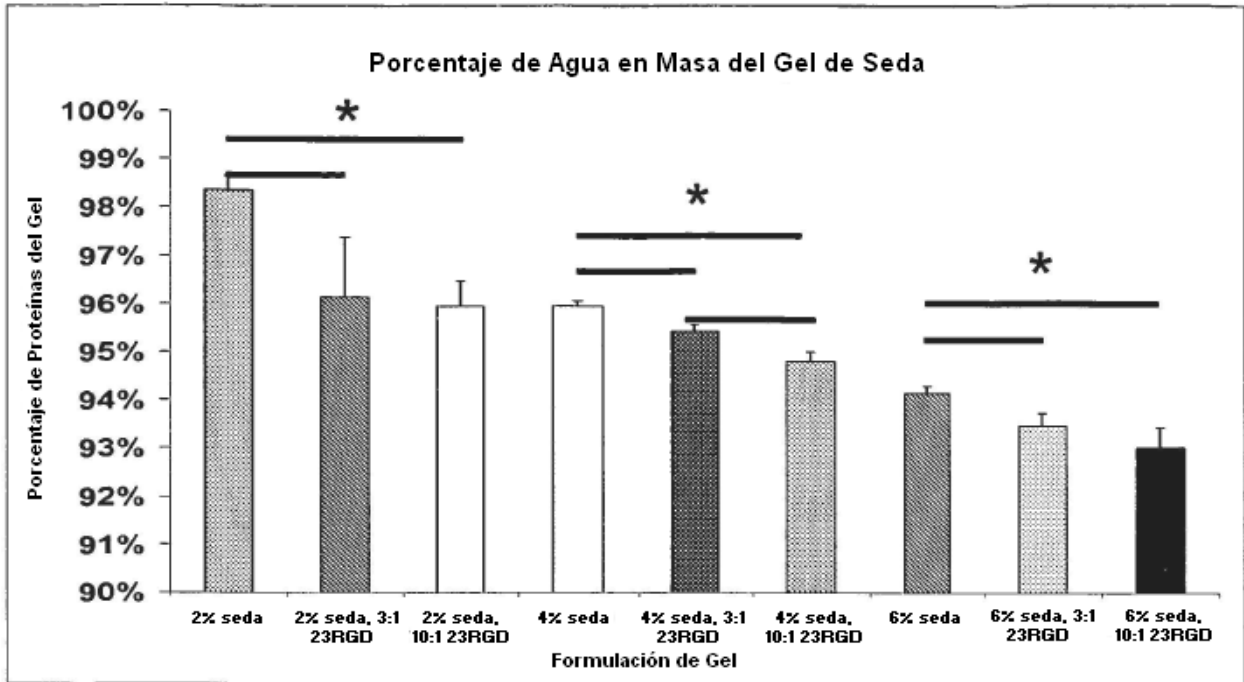


Figura 4

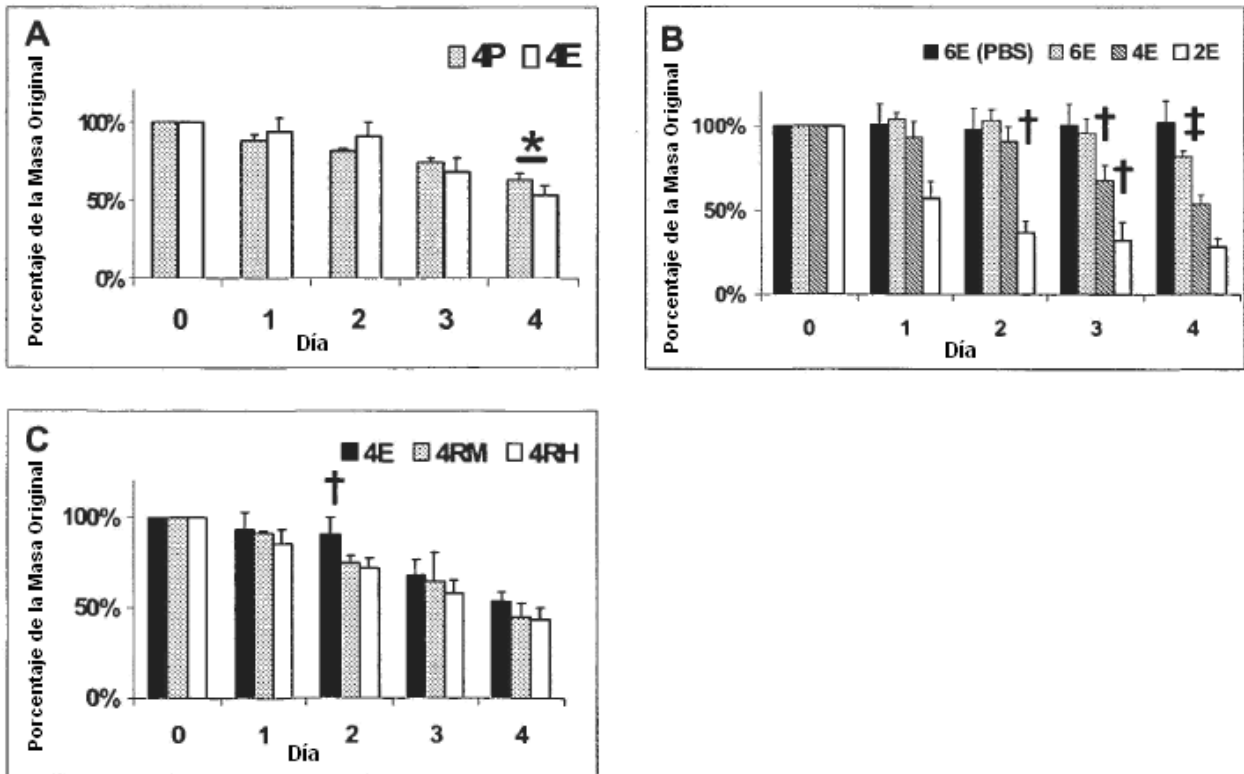


Figura 5

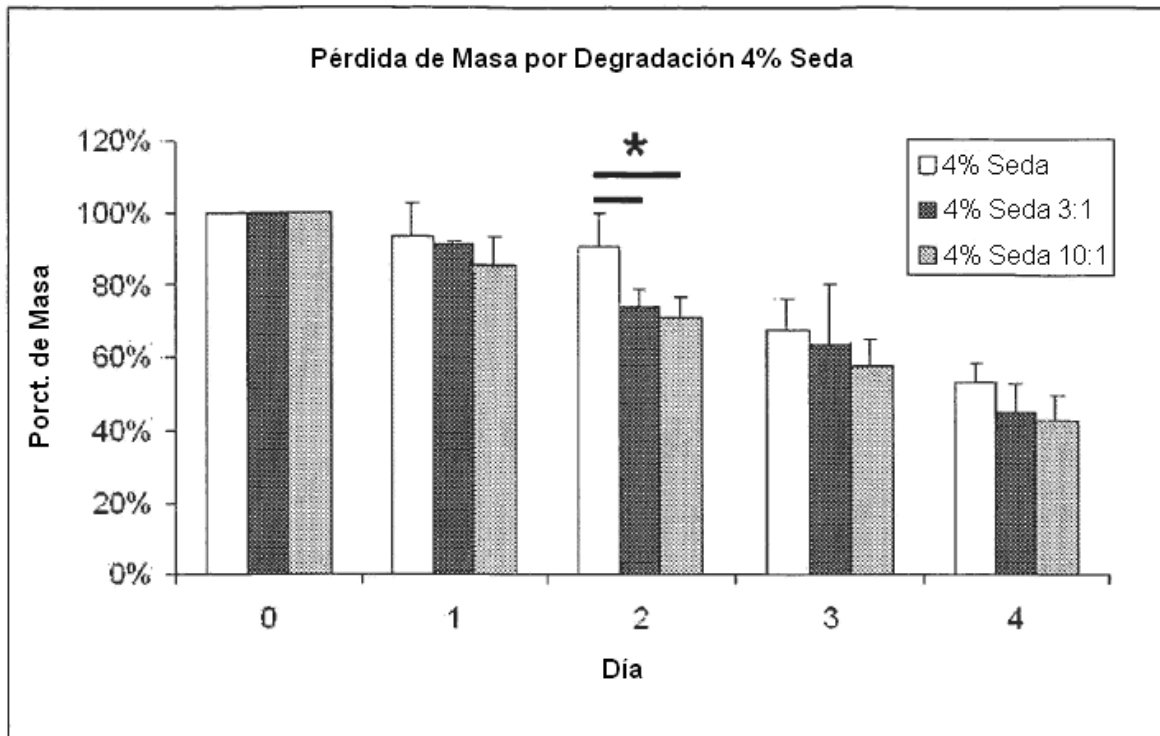


Figura 6

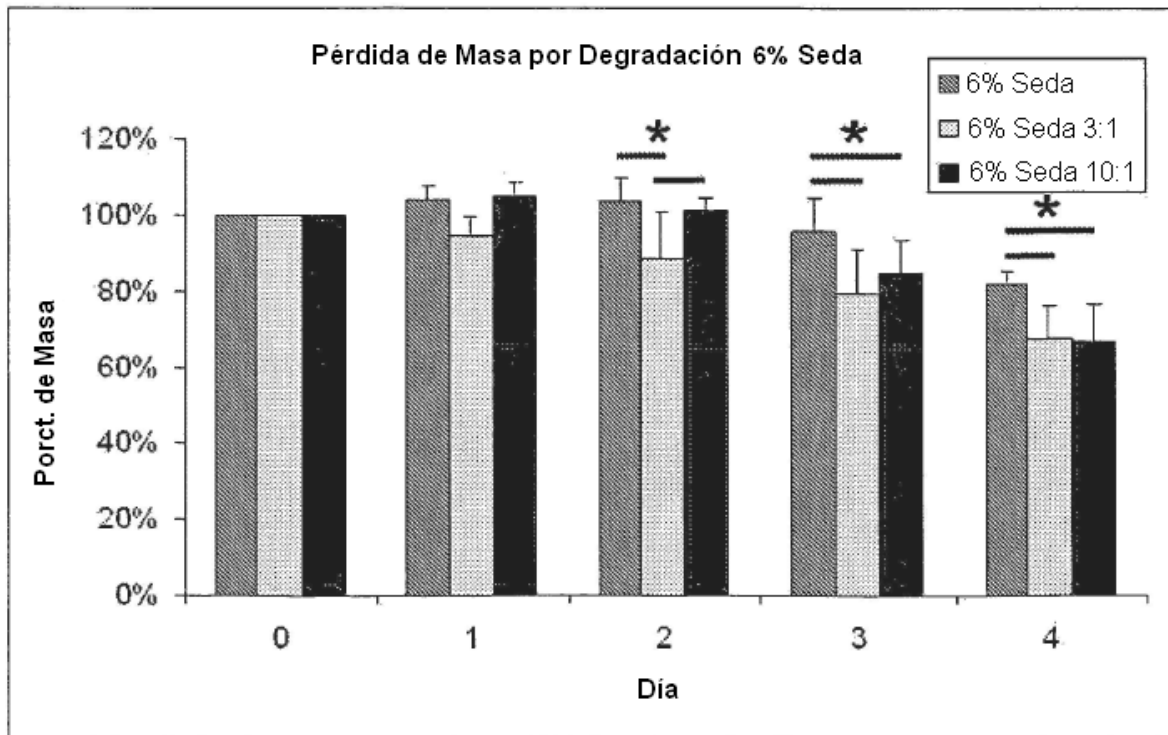


Figura 7

FIG. 8A

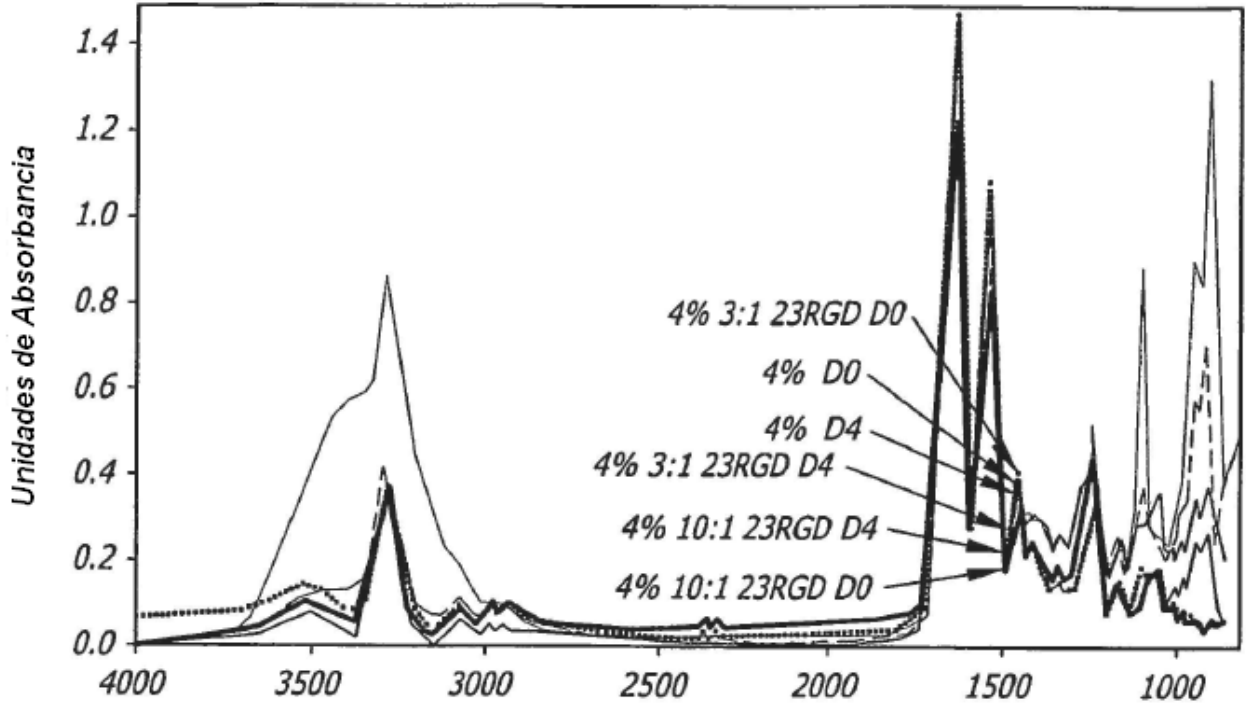


FIG. 8B

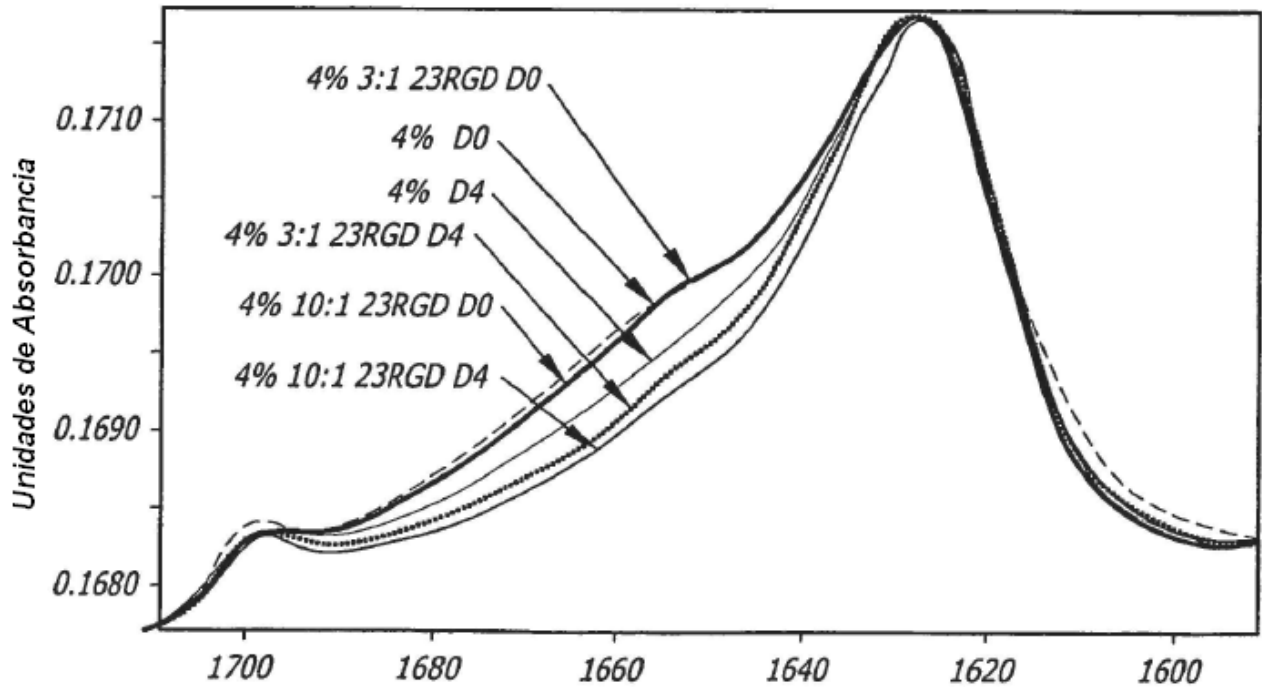


FIG. 8C

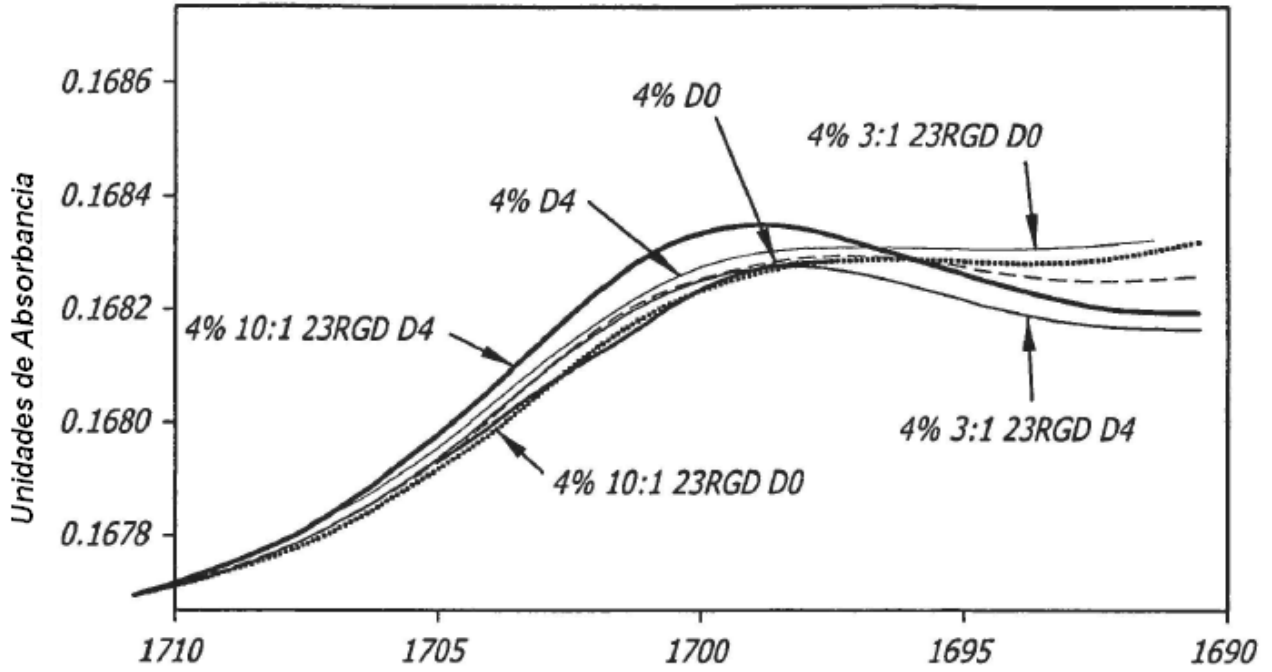


FIG. 8D

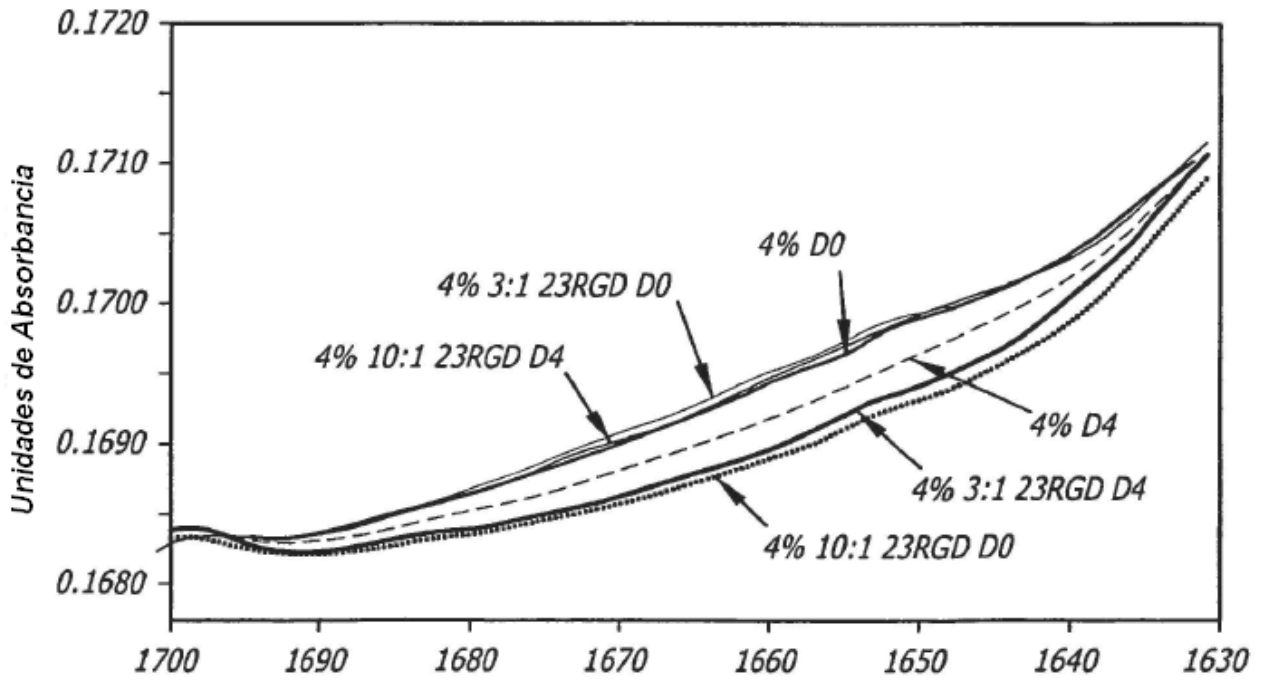


FIG. 8E

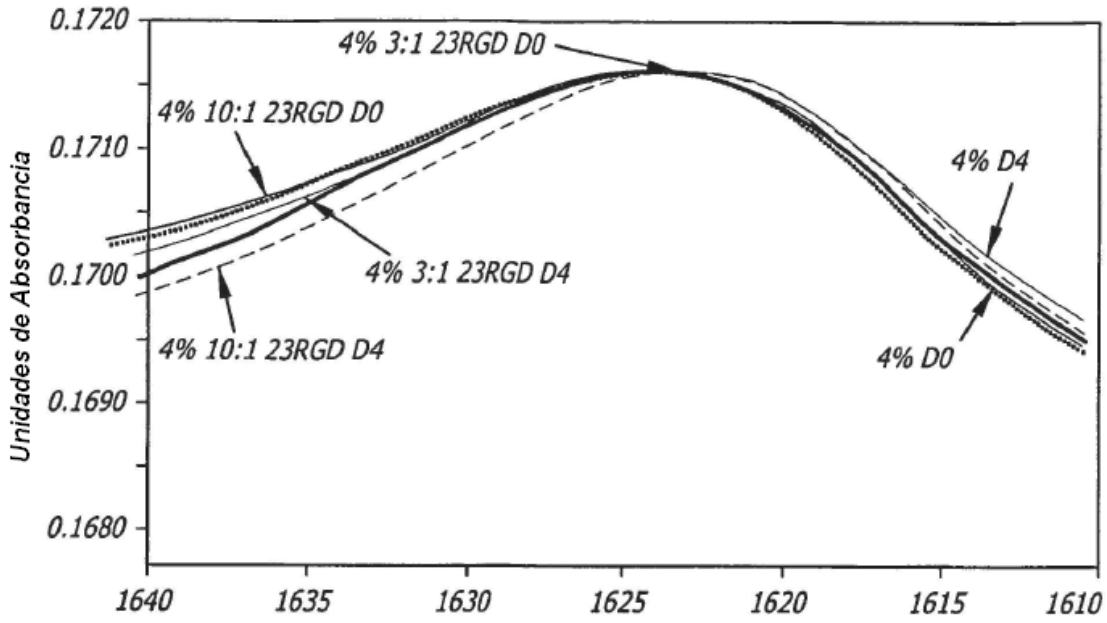


FIG. 9A

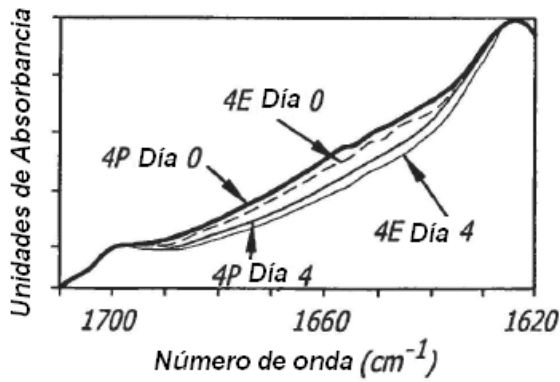


FIG. 9B

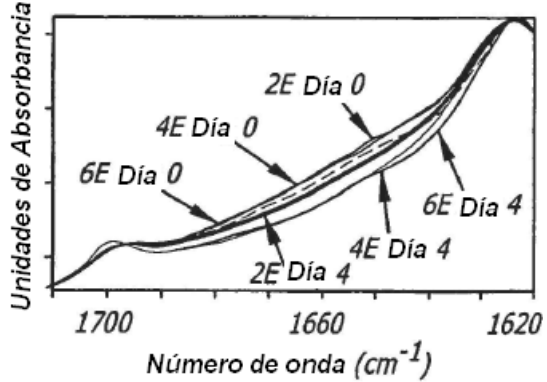
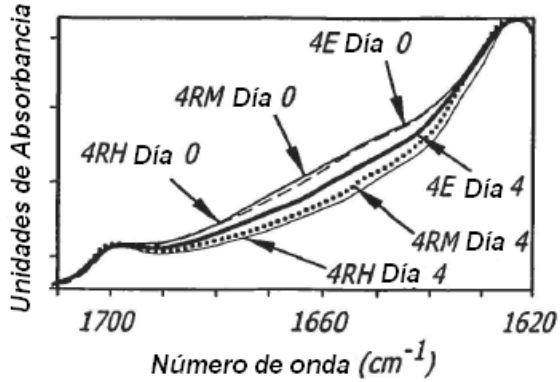


FIG. 9A



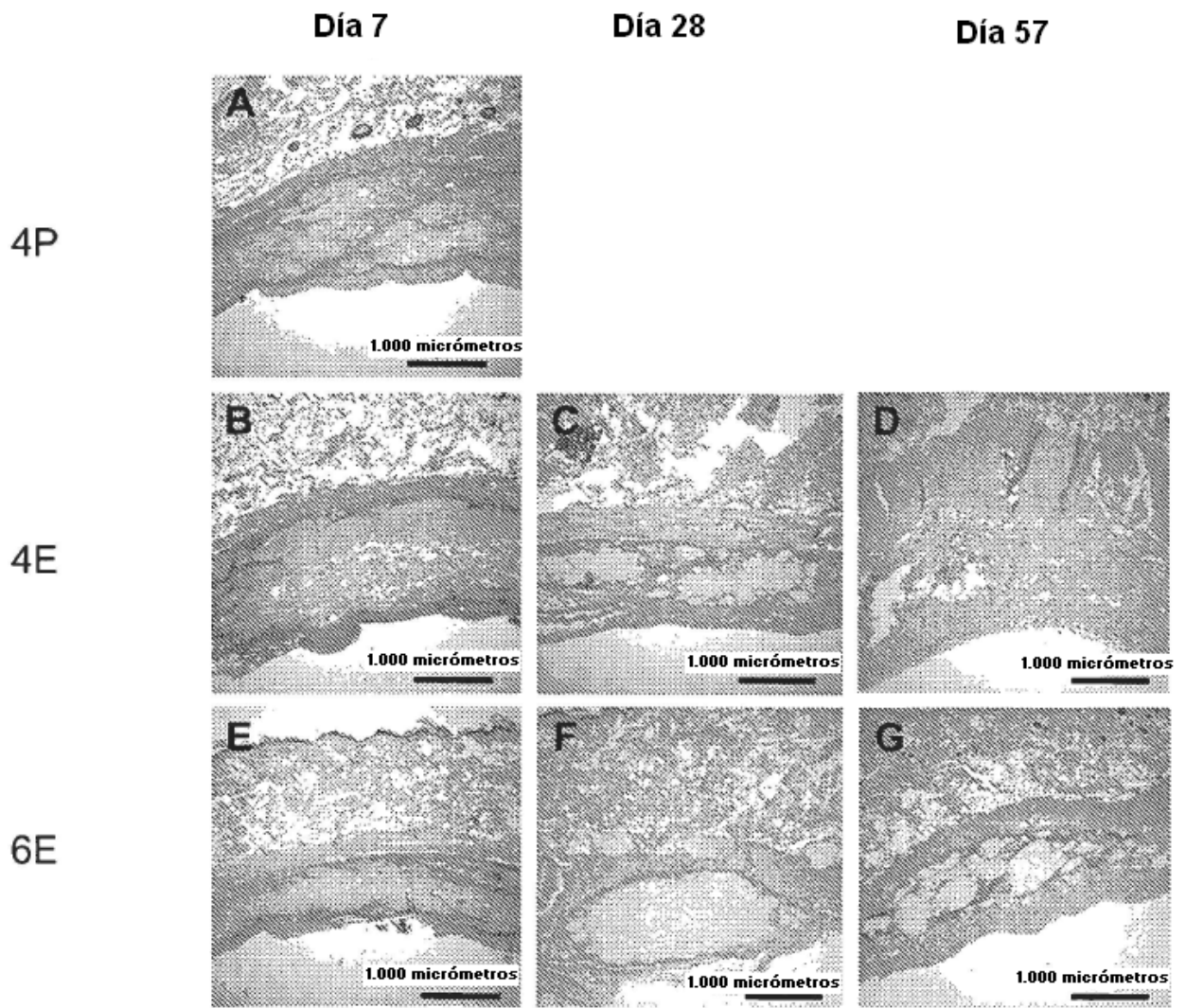
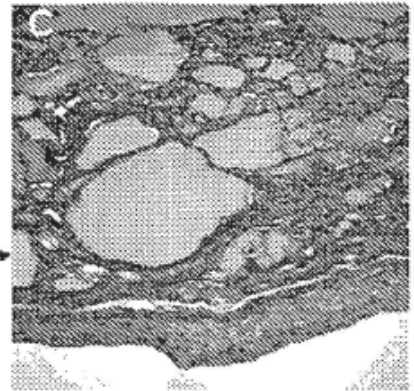
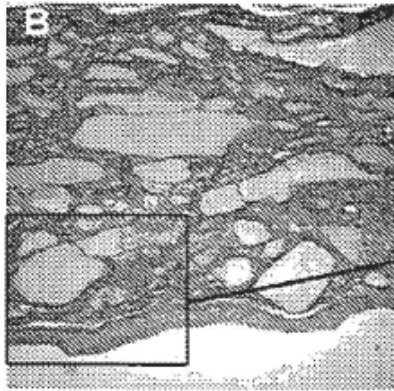
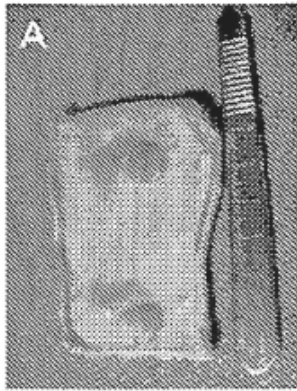
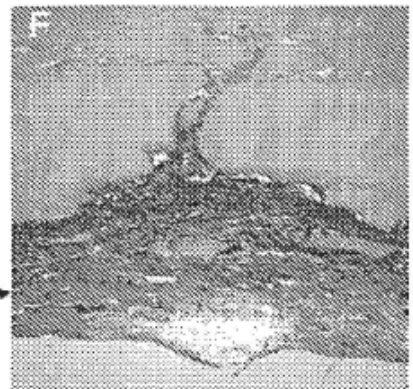
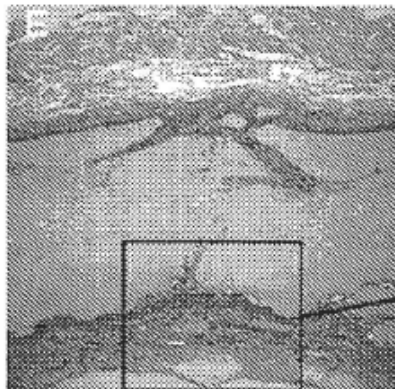


Figura 10



Sin tratar, 8% seda, dia 14



Tratado con RGD, 8% seda, dia 14

Figura 11

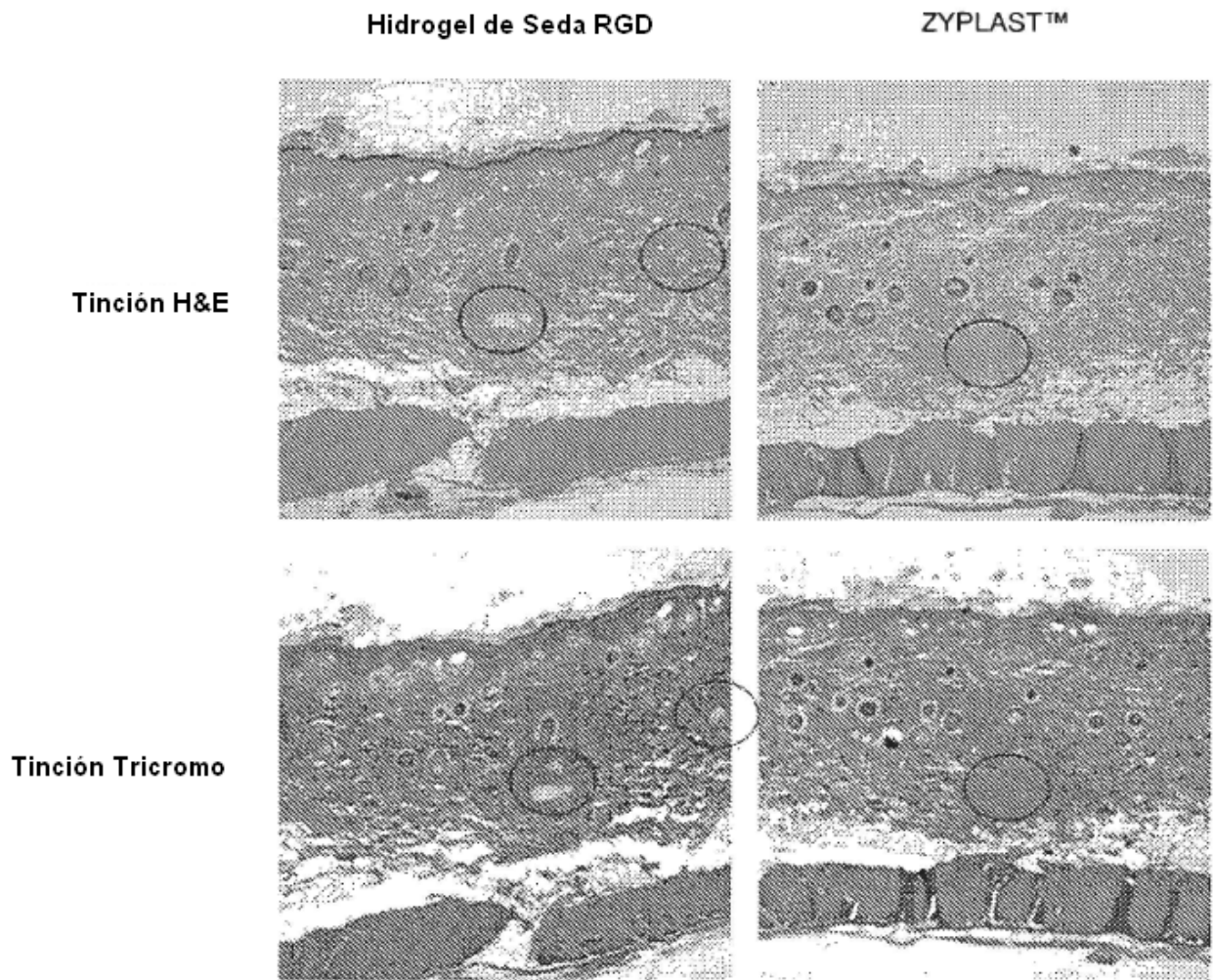


Figura 12

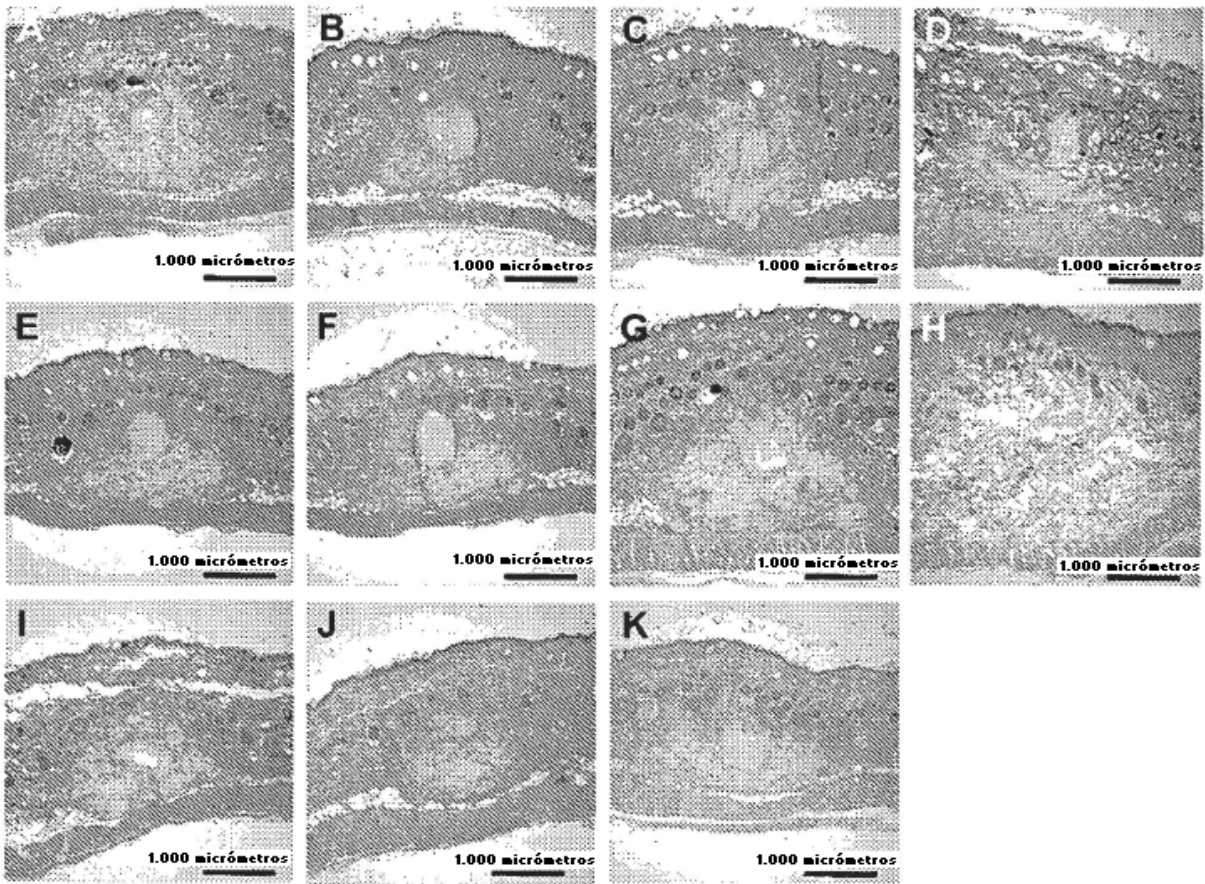


Figura 13

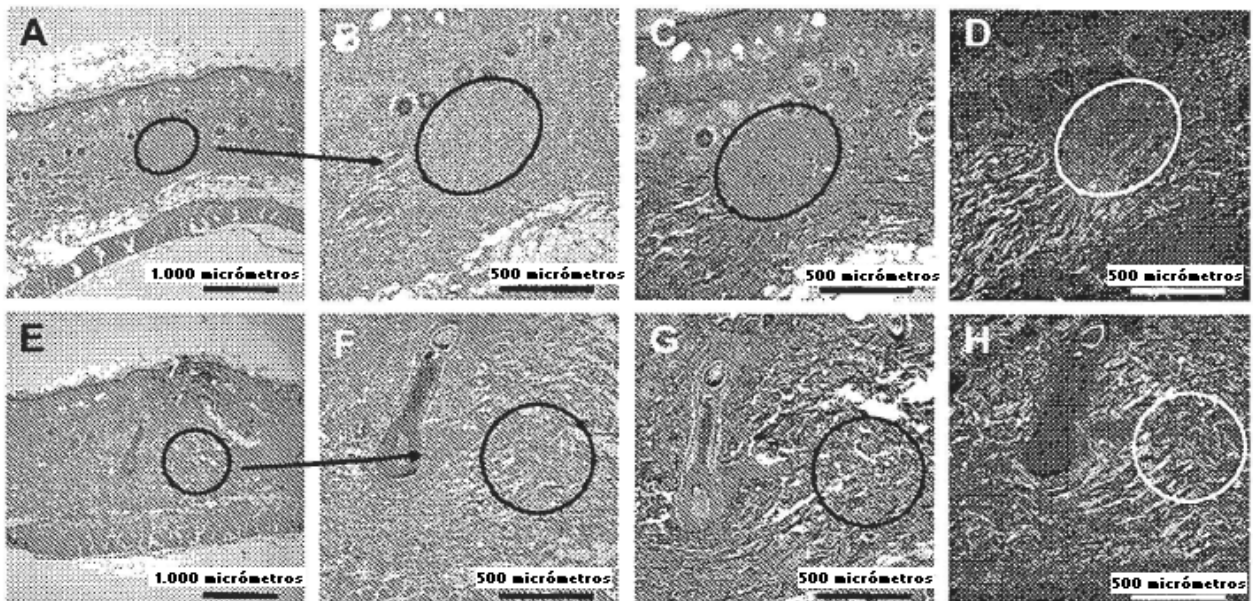


Figura 14

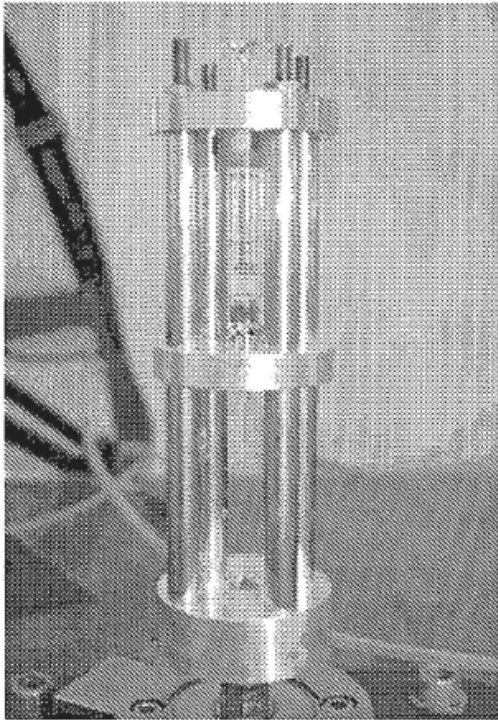


Figura 15

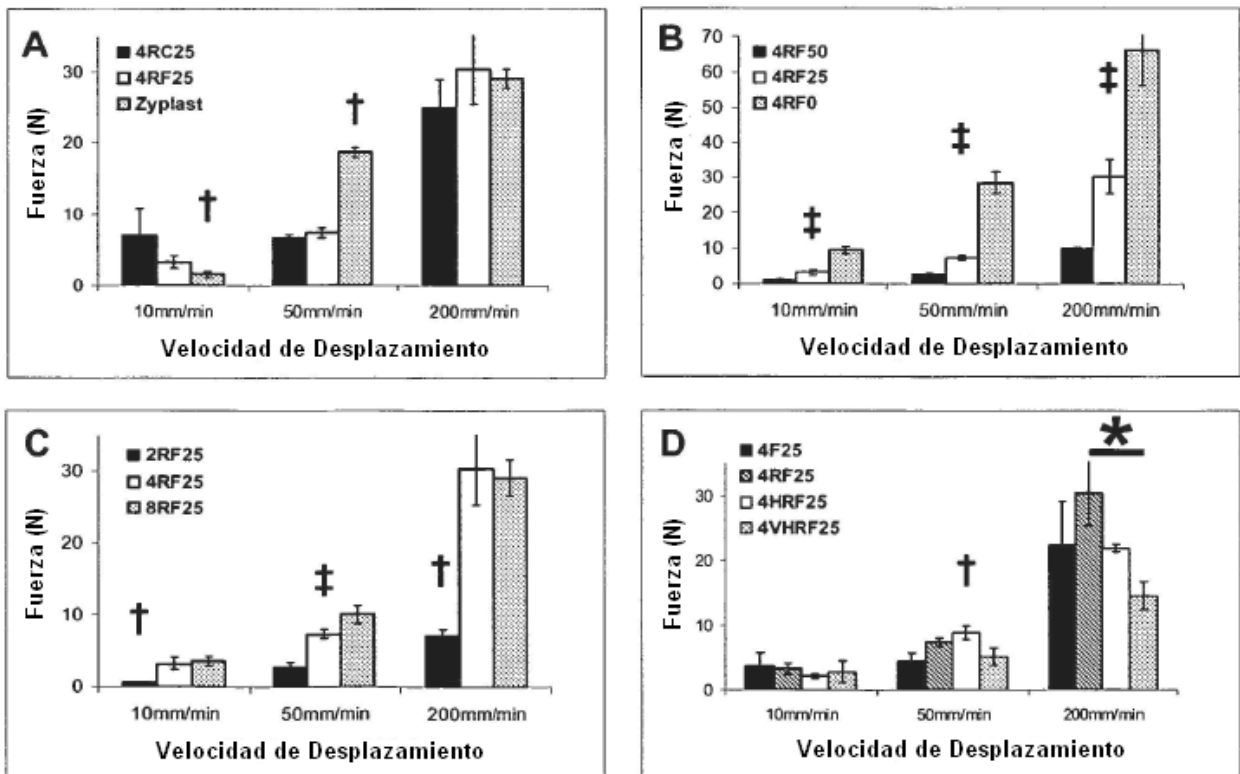


Figura 16

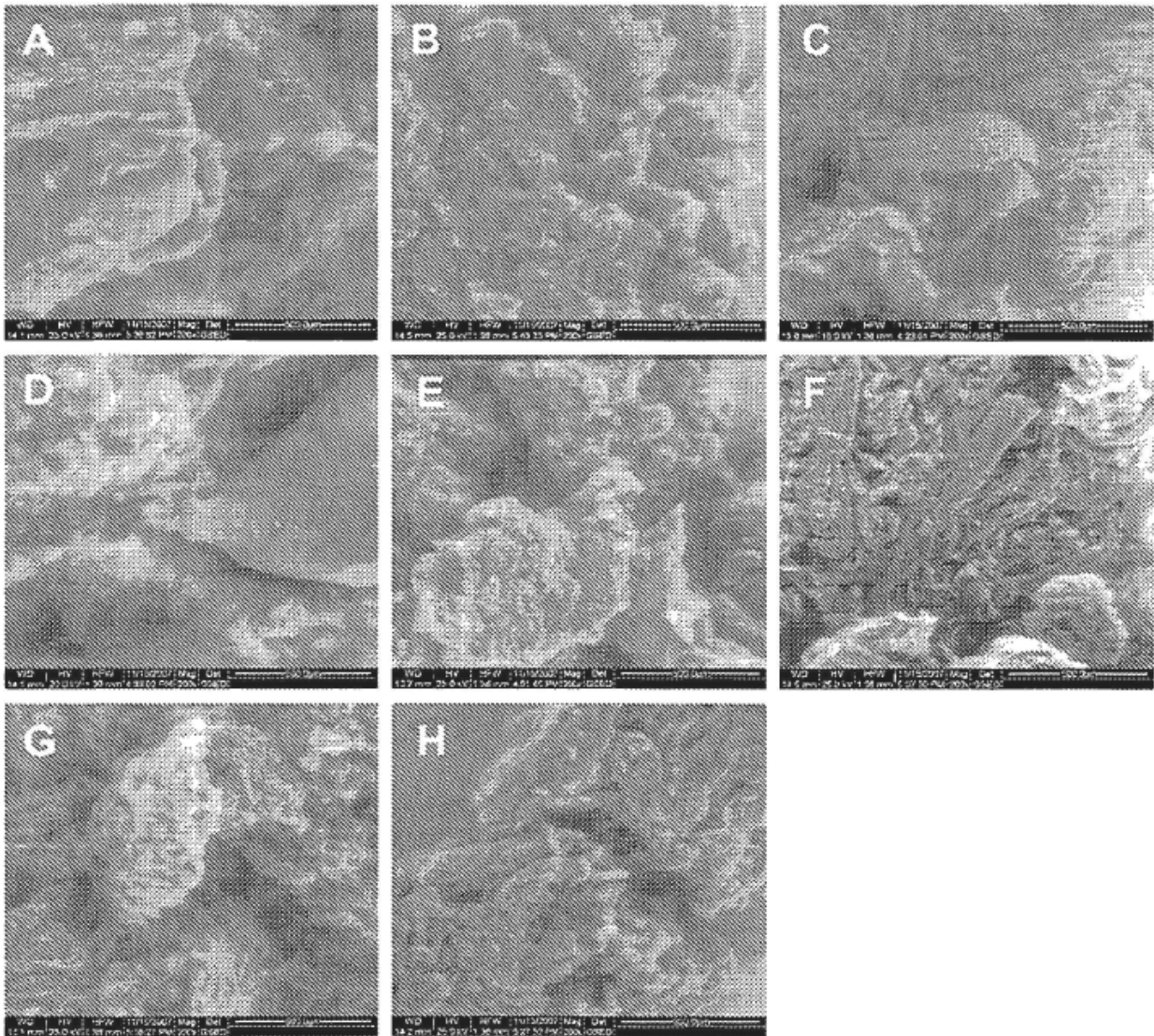


Figura 17

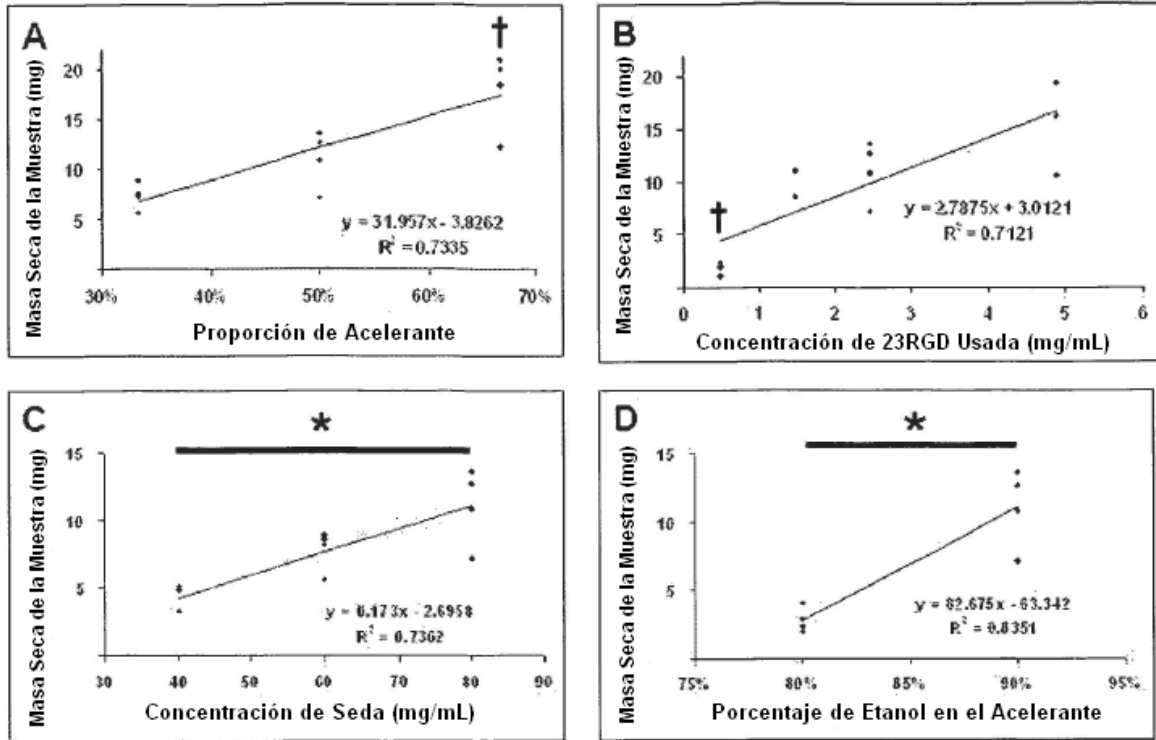


Figura 18

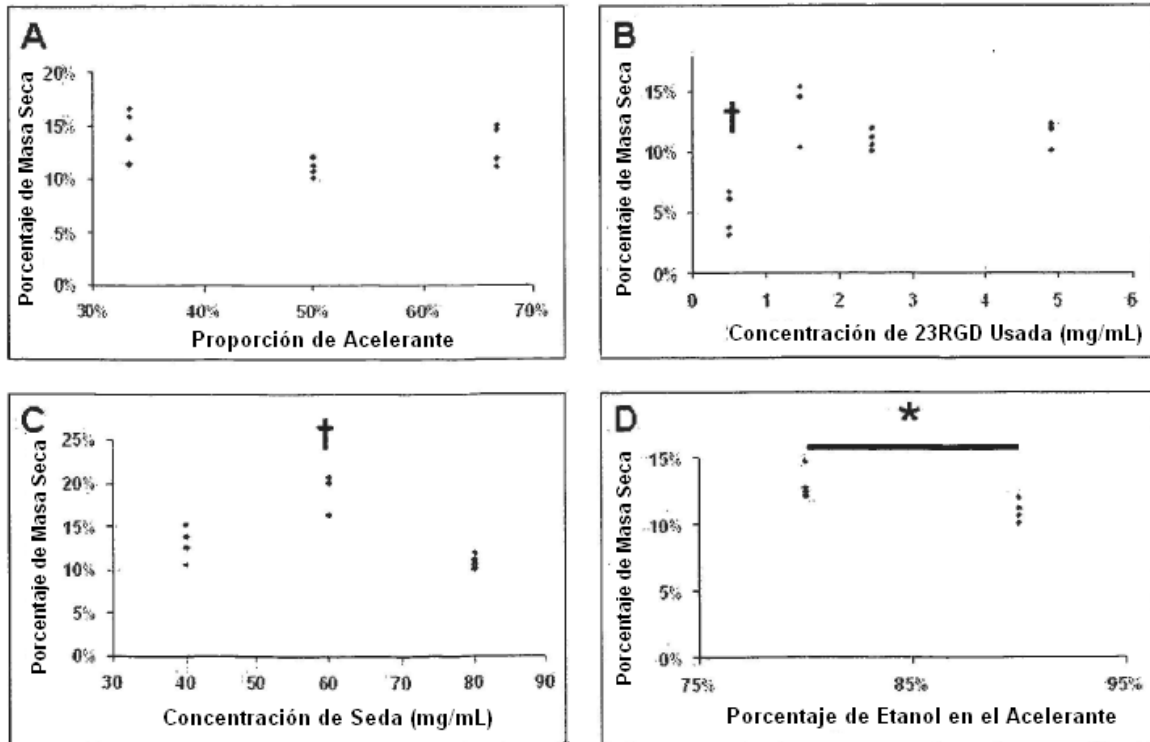


Figura 19

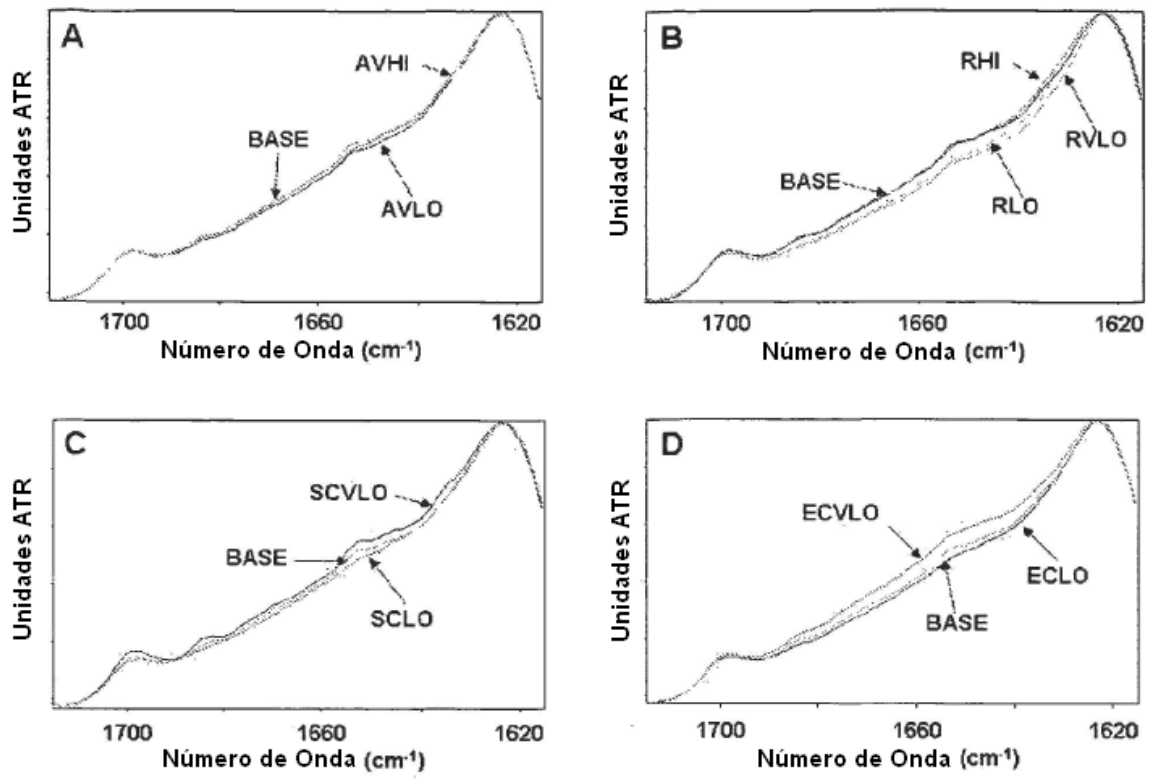


Figura 20

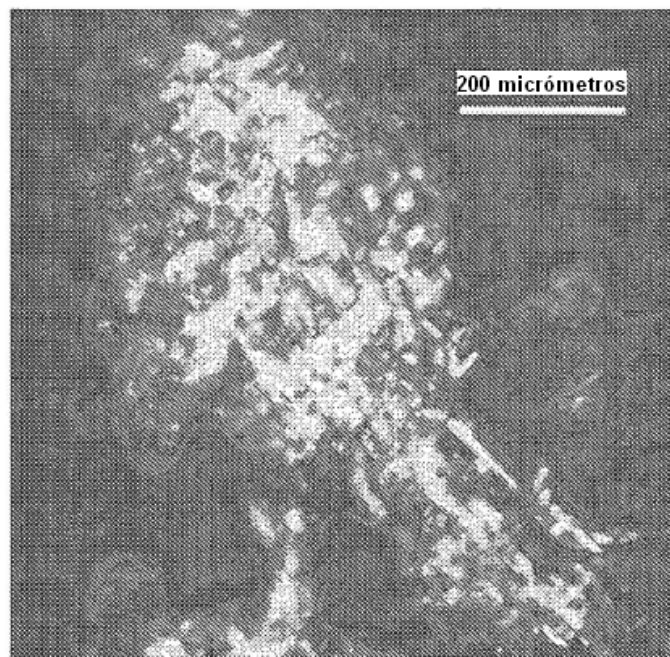


Figura 21

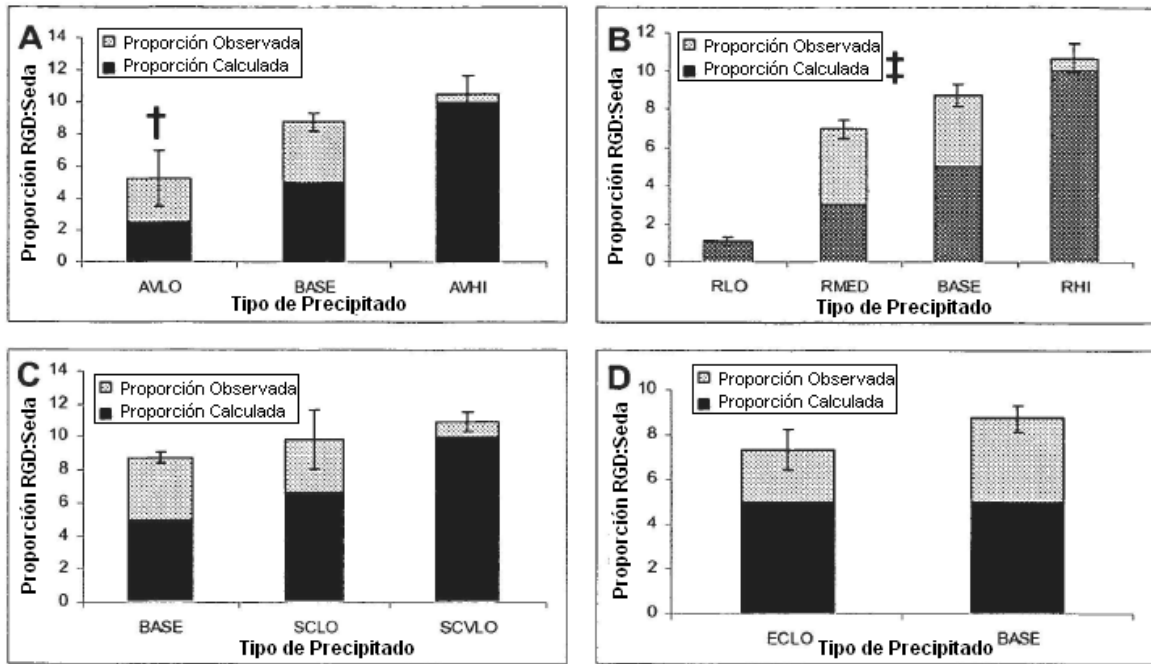


Figura 22

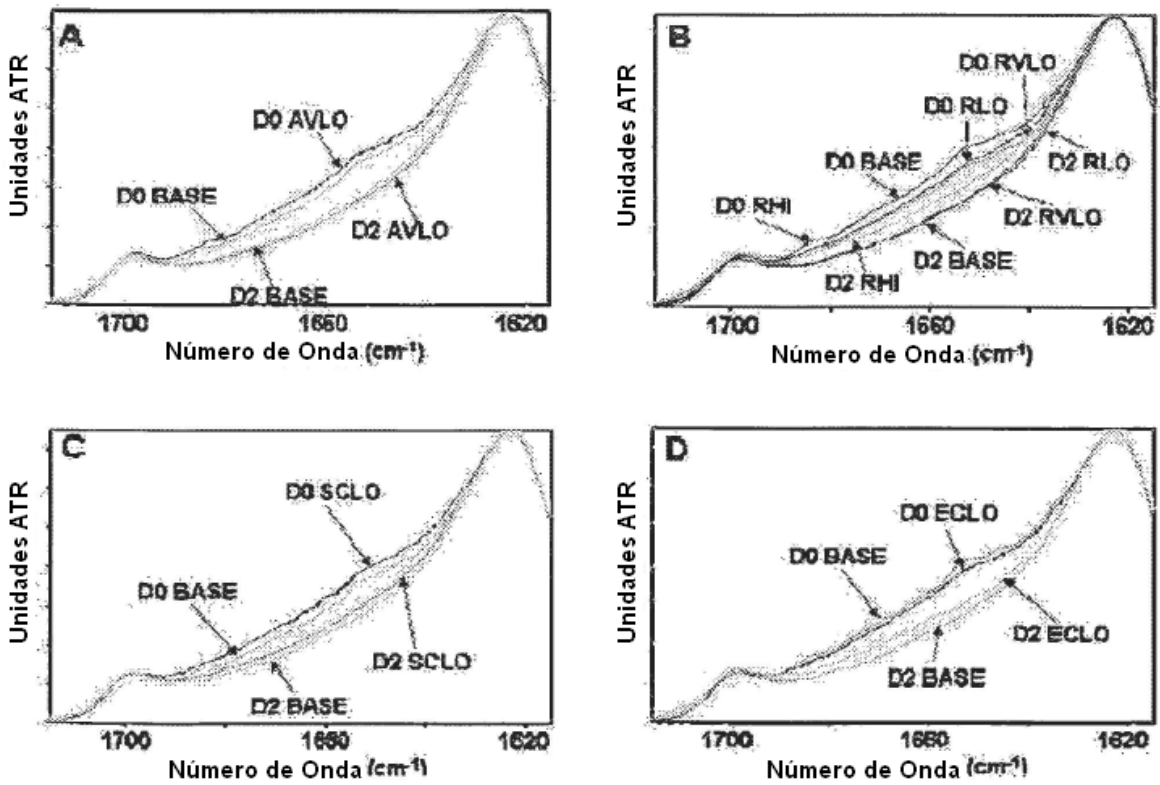


Figura 23