

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 481 342**

21 Número de solicitud: 201330095

51 Int. Cl.:

C07K 14/435 (2006.01)

A61L 27/22 (2006.01)

12

SOLICITUD DE PATENTE

A1

22 Fecha de presentación:

28.01.2013

43 Fecha de publicación de la solicitud:

29.07.2014

71 Solicitantes:

UNIVERSIDAD DE MURCIA (50.0%)

Avda. Teniente Flomesta nº 5

30003 Murcia ES y

INSTITUTO MURCIANO DE INVESTIGACIÓN Y

DESARROLLO AGRARIO Y ALIMENTARIO

(IMIDA) (50.0%)

72 Inventor/es:

VÍLLORA CANO, Gloria;

LOZANO PÉREZ, Antonio Abel y

CÉNIS ANADÓN, José Luis

74 Agente/Representante:

CARPINTERO LÓPEZ, Mario

54 Título: **Método para la obtención de partículas de fibroína regenerada empleando líquidos iónicos y ultrasonidos**

57 Resumen:

Método para la obtención de partículas de fibroína regenerada empleando líquidos iónicos y ultrasonidos.

La presente invención se refiere a un procedimiento para la disolución de proteínas fibrosas insolubles, o poco solubles, en agua (concretamente fibroína) que comprende mezclar dicha proteína con un líquido iónico fundido a temperatura inferior a 100°C y aplicar pulsos de ultrasonidos de alta potencia sobre la mezcla hasta su completa disolución. Asimismo, se contempla un procedimiento para obtener partículas de proteína (fibroína) regenerada a partir de la disolución homogénea de proteína en líquido iónico obtenido según el procedimiento anterior, que comprende el enfriamiento de la disolución hasta una temperatura comprendida entre 30 y 65°C, la dispersión de la disolución en un disolvente precipitante mantenido en agitación, la separación de las partículas de proteína regenerada en forma sólida de la disolución del disolvente precipitante, y el lavado y secado de las partículas. Finalmente, la presente invención se refiere a las partículas de fibroína regenerada obtenidas por dicho procedimiento.

ES 2 481 342 A1

DESCRIPCION

Método para la obtención de partículas de fibroína regenerada empleando líquidos iónicos y ultrasonidos

5

CAMPO DE LA INVENCION

La invención se enmarca en el sector de la Ingeniería Química y la Biotecnología para la producción de biomateriales empleados en Nanomedicina y productos para Dermocosmética. En concreto, la presente invención se refiere a un método para la obtención de partículas de proteína regenerada a partir de proteínas fibrosas insolubles o poco solubles en agua, mediante el empleo de la combinación de líquidos iónicos y ultrasonidos. Asimismo, se contemplan las partículas de proteínas regeneradas obtenidas con el método de la invención.

15

ANTECEDENTES DE LA INVENCION

La presente invención se puede aplicar a las proteínas fibrosas insolubles o poco solubles en agua que forman proteínas del tipo de la fibroína de la seda, debido a la capacidad de establecer múltiples enlaces de hidrógeno inter e intramoleculares que estabilizan su estructura, para ser regeneradas en forma de partículas con aplicaciones industriales o biomédicas, de entre las que destacan las proteínas de la seda.

Las propiedades únicas de la fibroína de seda, como la lenta biodegradación, sus propiedades mecánicas excepcionales, en combinación con la biocompatibilidad y capacidad para incorporar fármacos, han alimentado un creciente interés en este material para una gran variedad de aplicaciones, que van desde su uso textil hasta el biomédico en nanomedicina (*G. H. Altman, et al., Silk-based biomaterials, Biomater. 24 (3) (2003) 401–416*). De hecho, importantes estudios sobre la fibroína de seda han demostrado su gran aplicabilidad en biomedicina (*H. L. Wamsley, et al. Selected extraskeletal effects of systemic treatment with basic fibroblast growth factor in ovariectomized rats, Toxicol. Pathol. 33 (5) (2005) 577–583*; *S. Parveen, et al., Polymeric nanoparticles for cancer therapy, J. Drug Target. 16 (2) (2008) 108–123*; *J. L. Nelson, et al. Ultrasonically activated chemotherapeutic drug delivery in a rat model, Cancer Res. 62 (24) (2002) 7280–7283*).

35

La producción de partículas de biomateriales idóneos para diversas aplicaciones mediante métodos y tecnologías respetuosos con el medio ambiente sigue siendo un reto actualmente (M. A. Vandelli et al. *Gelatin microspheres crosslinked with -glyceraldehyde as a potential drug delivery system: preparation, characterisation, in vitro and in vivo studies. Int J Pharm.* 215 (2001)175-184; R. Arshady. *Review: biodegradable microcapsular drug delivery systems: manufacturing methodology, release control and targeting prospects. J Bioact Compat Polym.* 5 (1990) 315-342; A. D. George, et al. *Cross-linking of gelatin capsules and its relevance to their in vitro and in vivo performance. J. Pharm. Sci.* 83 (1994) 915-921)

10 Históricamente se han empleado dos estrategias para producir partículas a partir de soluciones de proteínas: técnicas de ensamblado asistido por moldes o bien una precipitación inducida por variaciones en las condiciones fisicoquímicas del medio de disolución. Un ejemplo del primer método es el uso de gotas de una emulsión para definir el tamaño y la forma de las partículas (E. Donath, et al. *Novel hollow polymer shells by colloid-*
 15 *templated assembly of polyelectrolytes. Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 37 (1998) 2201-2205; K. D. Hermanson, et al.. *Engineered microcapsules fabricated from reconstituted spider silk. Adv. Mater.* 19 (2007)1810-1815; X. Wang, et al. *Silk microspheres for encapsulation and controlled release. J Control Release.* 117 (2007) 360-370; E. Wenk, et al. *Silk fibroin spheres as a platform for controlled drug delivery. J Control Release.* 132 (2008) 26-34).
 20 Esta metodología permite el control del tamaño de partícula pero tiene el inconveniente de que es relativamente compleja y requiere estabilizantes de la emulsión y/o agentes entrecruzantes para mantener la rigidez de las partículas (M. A. Vandelli et al. *Gelatin microspheres crosslinked with, -glyceraldehyde as a potential drug delivery system: preparation, characterisation, in vitro and in vivo studies. Int J Pharm.* 215 (2001)175-184; A.
 25 S. Gobin, et al. *Silk-fibroin-coated liposomes for long-term and targeted drug delivery. Int J Nanomedicine.* 1 (2006) 81-87; O. P. Rubino, et al. *J. Albumin microspheres as a drug delivery system: relation among turbidity ratio, degree of cross-linking, and drug release. Pharm. Res.* 10 (1993) 1059-1065; A. B. MacAdam, et al. *Preparation of hydrophobic and hydrophilic albumin microspheres and determination of surface carboxylic acid and amino*
 30 *residues. Int. J. Pharm.* 151 (1997) 47-55).

Sin embargo, la estrategia de formación de partículas que hace crecer un núcleo de precipitación por adición de sucesivas moléculas de proteína mediante mezcla con un agente precipitante (disolvente en el que es insoluble la proteína; una sal precipitante; un
 35 cambio de pH; cambio de fuerza iónica, etc.) es relativamente simple y escalable y evita los inconvenientes de la estrategia anterior (C. Weber, et al. *Desolvation process and surface*

- characterisation of protein nanoparticles. *Int. J. Pharm.* 194 (2000) 91-102; M. C. Brick, et al. Formation of colloidal dispersions of organic materials in aqueous media by solvent shifting. *Langmuir*. 19 (2003) 6367-6380; Y. Q. Zhang, et al. Formation of silk fibroin nanoparticles in water-miscible organic solvent and their characterization. *J Nanopart Res.* 9 (2007) 885-900;
- 5 E. Allémann, et al. Preparation of aqueous polymeric nanodispersions by a reversible salting-out process: influence of process parameters on particle size. *Int. J. Pharm.* 87 (1992) 247-253; A. Reza. Microspheres and microcapsules, a survey of manufacturing techniques part II: coacervation. *Polymer Eng. Sci.* 30 (1990) 905-914; Reza. Microspheres and microcapsules, a survey of manufacturing techniques: part III: solvent evaporation. *Polymer*
- 10 *Eng. Sci.* 30 (1990) 915-924; D. Horn, et al. Organic nanoparticles in the aqueous phase e theory, experiment, and use. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 40 (23) (2001) 4330-4361; Z. Cao, et al. The preparation of regenerated silk fibroin microspheres. *Soft Matter*; 3 (2007) 910-915; U. K. Slotta, et al. An engineered spider silk protein forms microspheres. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 47 (2008) 4592-4594; A. Lammel, Processing conditions for the formation of
- 15 spider silk microspheres. *Chem. Sus. Chem.* 1 (2008) 413-416; S. Rammensee, et al. Assembly mechanism of recombinant spider silk proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 105 (2008) 6590-6595; B. Liebmann, et al. Formulation of poorly watersoluble substances using self-assembling spider silk protein. *Colloids Surf. A.* 331(2008) 126-132).
- 20 Diversas revisiones recogen los principales métodos de obtención de partículas de fibroína de seda nativa o transgénica para la liberación controlada de fármacos, (S. Andreas et al. Controlling silk fibroin particle features for drug delivery. *Biomaterials* 31 (2010) 4583-4591; E. Wenk et al. Silk fibroin as a vehicle for drug delivery applications, *Journal of Controlled Release*, 150, 2 (2011) 128-141) así como diversas formulaciones o presentaciones
- 25 alternativas a las partículas.

La seda es segregada por las glándulas sericígenas del gusano de seda (*Bombyx mori L.*) como un hilo continuo y puede medir hasta 1.500 metros. Consta principalmente de dos proteínas. Una de ellas es la fibroína, que es una proteína con dos subunidades unidas por

30 un puente disulfuro, que alterna dominios hidrofílicos y otros hidrofóbicos con tendencia a formar lámina beta estabilizada por múltiples enlaces de hidrógeno inter e intramoleculares. La otra proteína es la sericina, hidrosoluble y de estructura globular, que mantiene unidos los filamentos de fibroína. La sericina es normalmente desechada en el proceso textil, aunque tiene diversas aplicaciones en medicina y cosmética.

35

El punto de partida para la utilización de la seda como biomaterial, al igual que se hace para su utilización en la industria textil, es la eliminación de la sericina (aproximadamente un 25% en peso de la seda cruda). Ello se hace hirviendo la seda durante 45 minutos, en una solución jabonosa, o en carbonato sódico 0.02M, seguido de abundantes lavados con agua destilada. Tras el escurrido, se obtiene una madeja de textura similar al algodón, constituida en su totalidad por fibroína. El secado de la madeja puede durar varias horas (habitualmente toda la noche).

El procesado de la seda para la obtención de fibroína de seda regenerada (RSF) se realiza mediante un proceso de disolución de la fibra seguido de una etapa de coagulación. El proceso de regeneración consta usualmente de tres etapas, las cuales implican una etapa de disolución de la fibroína a la que ha eliminado la sericina, seguida de una etapa de diálisis para eliminar el exceso de sales y el secado, habitualmente por liofilización, para obtener un sólido amorfo que se redissuelve en la última etapa en una solución ácida (ácido fórmico ó ácido trifluoroacético, principalmente) o en un alcohol fluorado, principalmente el hexafluoroisopropanol (HFIP). La seda es entonces regenerada a partir de esta disolución por evaporación o precipitación. Las condiciones de precipitación tienen una considerable influencia en las propiedades finales de la RSF (*M. Tsukada, et al. Appl. Polym. Sci., 54 (1994) 507 ; J. Nam , et al. J. Appl. Polym. Sci. 81 (2001) 3008 ; M. E. Kinahan, et al., Biomacromolecules, 12 (2011) 1504*).

Tradicionalmente se han empleado dos tipos de soluciones para disolver las hebras de fibroína de seda: disoluciones acuosas de sales alcalinas altamente concentradas o soluciones salinas hidroalcohólicas.

Entre las primeras destacan la disolución de seda en una disolución de Bromuro de Litio (LiBr) 9.3M en agua a 60°C, durante 4 horas (*T. Asakura, et al. NMR of Silk Fibroin 2: 13C NMR Study of the Chain Dynamics and Solution Structure of Bombyx mori Silk Fibroin. Macromolecules, 17 (1984) 1075-1081; M. Tsukada, et al. Structural Changes of Silk Fibroin Membranes Induced by Immersion in Methanol Aqueous Solutions. J. Polym. Sci. B: Polym. Phys., 32 (1994): 961-968 ; C. C. Chen, et al. Characterization of Silk Crystallization Behaviour on Highly Oriented Substrates. Langmuir, 12 (1996) 1035-1039*), la disolución en Tiocianato de Litio (LiSCN) 9M en agua (*A. J. Sagar, et al. Properties of Silk Proteins Extracted in Saturated Lithium Thiocyanate Solution. Ind. J. Biochem. Biophys. 15 (1978) 59-61; N. V. Bhat, et al. Investigation of the Structure of Silk Fibroin Regenerated with Lithium*

Thiocyanate Solution. J. Polym. Sci.: Polym. Chem. Ed., 21 (1983) 1273-1280) o la disolución de CaCl₂ 50% (p/v) en agua.

Entre las hidroalcohólicas destacan las que emplean una mezcla de Nitrato de Calcio/Agua/Metanol ((Ca(NO₃)₂·4H₂O-MeOH) en relación molar Ca/H₂O/MeOH (1:4:2) (A. B. Mathur, et al. *The Dissolution and Characterization of Bombyx mori Silk Fibroin in Calcium Nitrate-Methanol Solution and Regeneration of Films. Biopolymers*, 42 (1997) 61-74; S. W. Ha et al. *Dissolution of Bombyx mori Silk Fibroin in the Calcium Nitrate Tetrahydrate-Methanol System and Aspects of Wet Spinning of Fibroin Solution. Biomacromolecules*. 4 (2003) 3488-496)) y el sistema Cloruro Cálcico/Agua/Etanol, con una relación molar CaCl₂/H₂O/EtOH (1:8:2) conocido como el método de Ajisawa (A. Ajisawa, *Dissolution of Silk Fibroin with Calcium chloride/Ethanol aqueous solution. J. Seric. Sci. Jpn.* 67 (1998) 91-94; I. C. Um, et al. *Structural Characteristics and Properties of the Regenerated Silk Fibroin Prepared from Formic Acid. Int. J. Biol. Macromol.* 29 (2001) 91-97; J. Nam, et al. *Morphology of Regenerated Silk Fibroin: Effects of Freezing Temperature, Alcohol Addition, and Molecular Weight. J. Appl. Polym. Sci.* 81(2001) 3008-3021).

En cualquier caso, las sales empleadas deben eliminarse por diálisis al menos durante dos días para posteriores usos de la disolución de proteína ya que contienen una elevada cantidad de sales (S. W. Ha et al. *Dissolution of Bombyx mori Silk Fibroin in the Calcium Nitrate Tetrahydrate-Methanol System and Aspects of Wet Spinning of Fibroin Solution. Biomacromolecules*. 4 (2003) 3488-496).

Al margen de estos sistemas de disolución de la fibroína de la seda, también se han ensayado otros sistemas que emplean Cuprietilendiamina u Óxido de N-metil morfolina (NMMO) (G. Freddie, et al. *Swelling and Dissolution of Silk Fibroin (Bombyx mori) in N-methyl morpholine N-oxide. Int. J. Biol. Macromol.* 24 (1999) 251-263) aunque se ha visto que causan una considerable degradación proteica durante el proceso de disolución.

En la línea de los métodos anteriores, que emplean sales para romper los enlaces de hidrógeno de las láminas beta para poder disolver la fibroína, Phillips et al. describieron en 2004 un método de disolución y regeneración de fibroína de seda para formar films empleando líquidos iónicos a elevadas temperaturas, que se concretó posteriormente en la patente US7671178B1 (D. M. Phillips, et al. *Dissolution and Regeneration of Bombyx mori Silk Fibroin Using Ionic Liquids, J. Am. Chem. Soc.* 126 (44) (2004) 14350-14351). Este

método necesitaba al menos varias horas a temperatura superior a 90°C, para conseguir la completa disolución de la proteína.

Los líquidos iónicos (ILs) son sales que se presentan en estado líquido a temperatura ambiente o próxima a ella. Son generalmente sales compuestas por cationes orgánicos, siendo los más comunes los de tetraalquilamonio, tetraalquilfosfonio, N-alkilpiridina y N,N'-dialquilimidazolio y por aniones, de los cuales los más comunes son hexafluorofosfato, tetrafluoroborato, triflimida y triflato. Estos nuevos disolventes presentan propiedades físicas y químicas muy interesantes entre las que pueden destacarse su prácticamente nula presión de vapor y su excelente estabilidad térmica y química. Otra ventaja que presentan los ILs es la posibilidad de modular finamente sus propiedades, tales como su densidad, viscosidad, punto de fusión, polaridad y miscibilidad con agua o disolventes orgánicos, permitiendo diseñar el IL más adecuado para cada aplicación, en función del tipo de anión y catión empleados. Por todo esto, los líquidos iónicos se han revelado como unos prometedores disolventes respetuosos con el medio ambiente y constituyen una alternativa a los disolventes orgánicos convencionales, incluso aumentando considerablemente la eficacia de la disolución (*J. D. Holbrey, et al. Clean Products and Processes I. (1999) 223-236; M. Freemantle, Chem. Eng. News. 79 (2001) 21-25; R. Sheldon, Chem. Commun. 23 (2001) 2399*).

Los líquidos iónicos también han demostrado su aplicabilidad como solventes en otros polímeros como la celulosa, PVA, poliuretano o mezclas de los mismos para formar composites con propiedades específicas para la diferentes aplicaciones (*Swatlowky et al. Dissolution of Cellulose with ionic Liquids. J. Am. Chem. Soc. 124 (2002) 4974-4975; S. Songmin. Physical properties of silk fibroin/cellulose blend films regenerated from the hydrophilic IL, Carbohydrate Polymers. 86 (2011) 462– 468; W. Li, et al. Preparation and Antibacterial Activity of Polyvinyl Alcohol/Regenerated Silk Fibroin Composite Fibers Containing Ag Nanoparticles, Journal of Applied Polymer Science, 123 (2012) 20–25*).

El ejemplo más reciente de empleo de líquidos iónicos para la disolución y precipitación de fibroína regenerada lo muestra Silke Brauer et al. en la patente US20090051068, en la que se describe un método para disolver proteínas en líquidos iónicos, en particular acetatos y cloruros de 1,3-dialquilimidazolio y consiguen regenerar la proteína formando fibras, hojas, films, tubos y membranas por precipitación de la solución de proteína con un disolvente, principalmente metanol, aunque no describe la formación de partículas discretas y el tiempo

necesario hasta alcanzar la completa disolución es de aproximadamente 160 minutos, a 90°C, para la fibroína en acetato de 1-butil-3-metil-imidazolio ([BMIM]Ac).

5 Estos antecedentes ponen de manifiesto la necesidad de obtener un método de disolución de proteínas insolubles en agua de forma rápida, eficiente y respetuosa con el medio ambiente que permita, en conjunción con un método adecuado de precipitación, la obtención de partículas de proteína regenerada de características adecuadas para su utilización en las aplicaciones demandadas por la industria y la biomedicina.

10 En base a esta necesidad, los autores de la presente invención, tras un importante trabajo de investigación, han desarrollado un nuevo método que permite obtener partículas de proteína regenerada a partir de proteínas fibrosas insolubles o poco solubles en agua. El método se basa principalmente en un nuevo procedimiento para la disolución de proteínas fibrosas insolubles, o poco solubles en agua, que combina el empleo de líquidos iónicos y
15 ultrasonidos.

Al contrario que el efecto de disolución conseguido con los líquidos iónicos, en la bibliografía sólo hay descrito el uso de los ultrasonidos para provocar la gelificación de la fibroína
(Kaplan et al. *Sonication-induced gelation of silk fibroin for cell encapsulation. Biomaterials*
20 *29 (2008) 1054–1064; WO2008150861*).

En la última revisión publicada por Kaplan et al. sobre métodos de fabricación de biomateriales (Kaplan et al. *Materials fabrication from Bombyx mori silk fibroin. Nat Protoc.*
25 *22;6(10)(2011) 1612-1631*), se recogen las duraciones aproximadas de los distintos procedimientos actualmente empleados para la preparación de los biomateriales, entre los cuales se encuentra la preparación de nano y micropartículas que requiere entre 2 y 5 días, frente a las 4-5 h que requiere el método de la presente invención. La aplicación de ultrasonidos permite acortar considerablemente el tiempo de disolución y por tanto reduce las posibilidades de degradación asociadas al uso de elevadas temperaturas durante largos
30 periodos de tiempo.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

35 **Figura 1.** Distribución del tamaño de partículas de fibroína de seda regenerada a partir de soluciones en [BMIM]Cl y precipitadas en MeOH sin tratamiento de ultrasonificación y con

tratamientos de ultrasonificación, con una amplitud de 285 μm usando un "Microtip" de 1/8" en un sonicador Branson 450, con pulsos de 30s durante 1 minuto, 5 minutos y 15 minutos.

5 **Figura 2.** Espectros de infrarrojo (% de Transmitancia "T" en función del número de onda en pastillas de KBr) de: A) [BMIM]Cl empleado como disolvente; B) las nanopartículas de seda regenerada a partir de la seda disuelta en [BMIM]Cl y C) las nanopartículas de seda regenerada a partir de la seda disuelta en $\text{CaCl}_2/\text{EtOH}/\text{H}_2\text{O}$.

10 **Figura 3.** Electroforesis en gel de Poliacrilamida en condiciones desnaturalizantes (SDS-PAGE Amersham ECL Gel 4-20% 10 pocillos, GE Healthcare) comparando los métodos de disolución de la seda más comunes y la disolución en [BMIM]Cl. Calles: 1. Marcador de pesos moleculares Benchmark de Invitrogen; 2. Solución de Fibroína en mezcla ternaria $\text{CaCl}_2/\text{EtOH}/\text{H}_2\text{O}$ (1:8:1); 3. Solución de Fibroína en LiBr 9.3 M; 4. Solución de Fibroína de capullos blancos en [BMIM]Cl; 5. Solución de capullos de seda blancos completos en [BMIM]Cl; 6 Solución de capullos de seda amarillos en [BMIM]Cl (calles de la 2 a la 6 con choque térmico desnaturalizante antes de cargar en el gel: 5 minutos 100 °C);

DESCRIPCIÓN DE LA INVENCIÓN

20 El objetivo de esta invención es la obtención de un método de disolución de proteínas fibrosas, poco solubles o insolubles en agua, de forma rápida y eficiente que permita, en conjunción con un método adecuado de precipitación, la obtención de partículas de proteína regenerada de características óptimas para su utilización en las aplicaciones demandadas por la industria y la biomedicina y que sea respetuoso con el medio ambiente, así como las

25 partículas obtenidas mediante este procedimiento.

Así, en primer lugar, en una realización principal, la presente invención se refiere a un procedimiento para la disolución de proteínas fibrosas insolubles, o poco solubles en agua (método de disolución de la invención), que comprende los siguientes pasos:

- 30
- a) Mezclar la proteína con un líquido iónico fundido a temperatura inferior a 100°C, y
 - b) Aplicar pulsos de ultrasonidos de alta potencia sobre la mezcla obtenida en a), hasta la obtención de una disolución homogénea de proteína en el líquido iónico.

35 La Ultrasonificación consiste en un dispositivo electrónico que transforma la corriente continua de 220V y 60Hz en corriente eléctrica a 20KHz que al llegar al "convertidor" es

convertida en vibraciones mecánicas. El núcleo del convertidor es un elemento electrosensible de Titanato Zirconato de Plomo, el cual cuando se somete a un voltaje alternante se expande y se contrae. El convertidor vibra en la dirección longitudinal y transmite su movimiento al huso metálico que está sumergido en la disolución, lo cual causa cavitación. La implosión de cavidades microscópicas resultantes en la solución provoca que las moléculas en el medio se vean agitadas intensamente.

El procedimiento para la disolución de proteínas en líquidos iónicos fundidos mediante la aplicación de ultrasonidos presenta una clara ventaja respecto a los métodos anteriormente descritos debido a que acorta considerablemente el tiempo de disolución y, por tanto, reduce las posibilidades de degradación asociadas al uso de elevadas temperaturas durante largos periodos de tiempo.

La aplicación de ultrasonidos presenta dos efectos sinérgicos que aceleran el proceso de disolución ya que, junto a la energía mecánica que produce la disgregación de las moléculas de proteína, el calor que se libera en el medio facilita la actividad solvente del líquido iónico, disminuyendo su viscosidad y facilitando la ruptura de los enlaces de hidrógeno inter e intramoleculares que originan la insolubilidad de la proteína en medio acuoso. El equipo de ultrasonidos permite la selección de una temperatura máxima de funcionamiento, para evitar sobrecalentamientos, preferentemente aquella que, proporcionando la mayor solubilidad de proteína en un menor tiempo evite la descomposición térmica de la proteína o de cualquiera de los componentes que puedan estar incluidos en la disolución.

En realizaciones particulares, los pulsos de ultrasonido empleados en el método de la presente invención, presentan un rango de amplitud máximo (en función del accesorio del dispositivo empleado), entre 21 (10% de amplitud máxima con el huso grueso) a 494 μm (70% de amplitud máxima con el huso fino) a una potencia máxima de 400W, elevando la temperatura de la mezcla hasta 80-150°C. No obstante, existen equipos de ultrasonido con amplitud similar pero con potencias menores o equipos industriales con potencias mucho mayores (más de 2000W).

Así, por ejemplo, la amplitud máxima es de 145 μm cuando se utiliza el "Tapered Disruptor Horn" de 1/2" y puede llegar a 494 μm con el "Microtip" de 1/8". De forma preferida, las amplitudes en μm del rango de trabajo serían entre 21 μm el "Disruptor Horn" de 1/2") y 285 μm con el "Microtip" de 1/8". El uso de uno u otro accesorio está en función del volumen a

tratar. Así, para volúmenes inferiores a 10mL se puede emplear el Microtip de 1/8” y para volúmenes superiores el “Disruptor Horn” de 1/2”.

En una realización particular, el líquido iónico está compuesto por un catión orgánico, que se selecciona de entre imizadolio, piridinio, pirimidinio, pirazinio, pirazolio, oxazolio, 1,2,3, triazolio, trozolio, piperidinio, pirrolidinio, quinolinio, isoquinilio y alquilamonio, preferiblemente imidazolio y, un anión que se selecciona de entre un haluro (fluoruro, cloruro, bromuro o ioduro), perclorato, pseudohaluro (tiocianato, cianato, dicianoamidas, fulminato, azida, tetrahaloaluminatos, tetrafluoroborato, haloalquilboratos, bistrifilamida, hexafluorofosfato ó trifluorosulfonato), y carboxilatos C1-C6 (formiato, acetato, propionato, butirato, hexanoato, maleato, fumarato, oxalato, lactato, piruvato y similares), preferiblemente haluro. Los líquidos iónicos son solubles en agua y disolventes orgánicos próticos o apróticos moderadamente polares o cualquier mezcla de ellos, y presentan una temperatura de fusión inferior a 150°C.

Adicionalmente, en realizaciones particulares, el líquido iónico puede contener ciertos aditivos, es decir, otros compuestos disueltos o dispersos previamente a la adición de las proteínas en a), que pueden quedar incorporados a la proteína regenerada o servir como estabilizantes/conservantes de la solución de proteína en el líquido iónico, tales como moléculas orgánicas con actividad biológica (fármacos, antibióticos, antioxidantes entre otros), biomoléculas (enzimas, carbohidratos, lípidos entre otros), compuestos inorgánicos (sales, compuestos de coordinación de metales de transición, materiales cerámicos o compuestos, entre otros), o mezclas de los anteriores.

Las proteínas pueden estar constituidas por proteínas fibrosas, poco o nada solubles en agua, nativas y/o transgénicas, capaces de formar enlaces por puente de hidrógeno intra e intermoleculares fuertes. De forma preferida las proteínas son proteínas de seda de artrópodos (insectos, lepidópteros, himenópteros, ácaros y arácnidos), más preferiblemente fibroína, sola o en combinación con otras proteínas, carbohidratos como la celulosa, moléculas orgánicas o compuestos inorgánicos disueltos en el líquido iónico o dispersos en el mismo.

El procedimiento descrito para la disolución de proteínas en líquidos iónicos mediante la aplicación de ultrasonidos emplea preferiblemente proporciones de líquido iónico/proteína desde 99:1 hasta un 70:30, preferentemente 90:10.

35

La viscosidad de las disoluciones de seda en líquidos iónicos puede en ocasiones superar 100Pa·s, lo que dificulta trabajar con la mezcla, ya que la seda se coagula de forma amorfa en lugar de formarse la dispersión homogénea de partículas. Cuando se le añade agua se consigue disminuir la viscosidad y al caer sobre el agente precipitante dispersa instantáneamente favoreciendo la formación de micro- o nanopartículas de seda.

Así, de forma opcional, para disminuir la viscosidad de la disolución de proteína en los líquidos iónicos fundidos (obtenida en b), se contempla la adición de un cosolvente compatible con la proteína, preferiblemente agua, en pequeños incrementos de un 5% hasta alcanzar un máximo de un 25% en peso en la mezcla final. Para obtener partículas discretas, la viscosidad de la disolución de proteína debe ser inferior a 0.1Pa·s. De esta forma la desolvatación es eficaz facilitándose el proceso de agregación de suficientes moléculas de proteína para formar partículas.

Para la obtención de las partículas de proteína regenerada, el método para la disolución homogénea de proteína en el líquido iónico descrito, se combina con un método adecuado de precipitación.

Así, en otra realización principal de la invención se contempla un procedimiento para la obtención de partículas de proteína regenerada a partir de proteínas fibrosas insolubles o poco solubles en agua que comprende los siguientes pasos:

- i) Obtención de una disolución homogénea de proteína en líquido iónico según el método de disolución de la invención,
- ii) Enfriamiento de la disolución obtenida en i) hasta una temperatura comprendida entre 30 y 65°C, preferiblemente 45°C,
- iii) Dispersión de la disolución obtenida en ii) en un disolvente precipitante mantenido en agitación vigorosa,
- iv) Separación de las partículas de proteína regenerada en forma sólida formadas en iii) de la disolución del disolvente precipitante conteniendo el líquido iónico,
- v) Lavado de las partículas de proteína regenerada separadas en iv) con agua destilada, desionizada o ultrapura, y
- vi) Secado de las partículas de proteína regenerada lavadas en v).

35

Una vez que se ha obtenido la disolución homogénea de proteína en el líquido iónico, con o sin la adición de agua, antes de proceder a la insolubilización se debe rebajar la temperatura de la mezcla a un valor entre 30 y 65°C, preferentemente a 45°C, para evitar provocar la ebullición del disolvente precipitante al entrar en contacto con la mezcla manteniendo una viscosidad adecuada para poder hacerla gotear sobre el disolvente precipitante mantenido en agitación vigorosa.

Frente a los métodos de obtención de proteínas regeneradas descritos anteriormente, en la presente invención la dispersión se lleva a cabo en un gran volumen de disolvente precipitante mantenido en agitación vigorosa. De esta manera, las gotas de proteína disuelta en el líquido iónico se disgregan rápidamente debido a la fuerte agitación y a la baja concentración local de líquido iónico en el entorno de la gota, lo que produce la desolvatación de la proteína y la coagulación en forma de partículas discretas.

La agitación vigorosa se mantiene para asegurar el cambio de conformación de la proteína que la insolubilice, a la vez que se extrae el líquido iónico de las partículas. De forma preferida, la dispersión se mantiene en agitación entre 1 y 24 horas, preferiblemente 2h, para permitir la difusión del líquido iónico desde el interior de las partículas sólidas hasta el solvente precipitante y el cambio de conformación de la proteína que asegure su insolubilidad en agua.

En una realización particular, la proporción en peso entre el disolvente precipitante y la solución de proteína en líquido iónico se encuentra comprendida entre un 70:30 y 95:5.

Se emplea como precipitante un disolvente orgánico moderadamente polar, prótico o aprótico, o cualquier mezcla de ellos. De forma preferida se selecciona entre metanol, etanol, isopropanol, acetona, acetonitrilo, agua, DMSO, THF y combinaciones de los mismos. De forma preferida, el disolvente precipitante empleado se encuentra a una temperatura entre su punto de fusión y 4°C.

En el caso de la fibroína, el metanol es el precipitante ideal, ya que presenta una combinación de cualidades que lo destacan del resto de disolventes. Por un lado disuelve el líquido iónico, y el agua que pueda contener, mientras que la fibroína es insoluble en él, y además de la insolubilización provoca un cambio conformacional en la proteína induciendo la formación de lámina beta con formación de enlaces de hidrógeno inter e intracatenarios que caracterizan a la proteína insoluble en agua.

Así, en una realización preferida se emplea metanol 95:5, previamente enfriado a -20°C , y la dispersión se realiza con una agitación vigorosa del medio precipitante mientras se adiciona lentamente la solución de proteína.

- 5 La proteína precipitada en forma de partículas se separa del precipitante, conteniendo el líquido iónico pero no la proteína, mediante centrifugación, filtración, el uso de membranas o cualquier otro método de separación S-L adecuado al tamaño de partícula y la viscosidad de la disolución.
- 10 La fuerza necesaria para la completa precipitación de las partículas varía con el tamaño de las partículas y la densidad del disolvente. Así, micropartículas precipitan completamente de la dispersión en MeOH centrifugando a 12.000g durante 15 minutos, mientras que para precipitar nanopartículas en agua se necesitan 30 minutos a 18.000g.
- 15 Así, en realizaciones preferidas, la centrifugación se lleva a cabo a fuerzas mayores de 12.000 g.

En realizaciones particulares, el líquido iónico disuelto en el disolvente precipitante se puede recuperar para su reutilización, de forma preferida mediante destilación a vacío (rotavapor a
20 vacío), aprovechando la prácticamente nula presión de vapor del mismo.

Una vez eliminado el disolvente precipitante, aunque no es imprescindible, resulta conveniente hacer un nuevo lavado con el mismo volumen de disolvente fresco para arrastrar los posibles restos de líquido iónico que puedan haber quedado adsorbidos en las
25 partículas.

Posteriormente se lavan las partículas con agua para eliminar cualquier resto de líquido iónico y disolvente y se secan para su conservación. De forma preferida, el lavado de las partículas se lleva a cabo con agua ultrapura (MilliQ $18.2\text{M}\Omega\cdot\text{cm}$). En el caso de emplear
30 cloruros de alquil imidazolio, se puede emplear el método de adición de AgNO_3 para identificar la presencia de iones cloruro en los restos del lavado. Aunque no es imprescindible, de forma opcional puede aplicarse ultrasonificación para resuspender y dispersar las partículas durante la etapa de lavado con agua con efecto de facilitar la disgregación, uniformizar y seleccionar el tamaño de partícula y facilitar el acceso del agua a
35 los poros de las partículas para extraer el líquido iónico y el solvente de precipitación.

Así, sin aplicar la sonicación durante las etapas de lavado se obtienen partículas de $>1 \mu\text{m}$. Sin embargo, aplicando ultrasonificación a la suspensión de partículas se pueden obtener partículas de un tamaño comprendido entre 35 y 120 nm.

- 5 Finalmente, las partículas lavadas en agua se secan mediante un proceso de secado poco agresivo, como por ejemplo liofilización, secado en corriente de nitrógeno, en estufa o en concentrador automático. De forma preferida se emplea la liofilización a temperaturas comprendidas entre -20 y -80°C , preferentemente a -55°C y a presiones de vacío comprendidas entre $1 \cdot 10^{-4}$ bar y $5 \cdot 10^{-2}$ bar, preferentemente $5 \cdot 10^{-3}$ bar, por la capacidad de
10 preservar las biomoléculas y los aditivos que puedan acompañarlas frente a la degradación o descomposición térmica.

Finalmente, en otra realización principal de la invención se contemplan las partículas de proteína regenerada obtenidas por el procedimiento descrito. Dichas partículas presentan
15 tamaños micro y/o nanométricos, preferentemente en el rango comprendido entre 20 y 200 nm.

EJEMPLOS

- 20 Ejemplo 1. Disolución de fibroína de seda lavada en cloruro de 1-butil-3-metil imidazolio ([BMIM]Cl) y obtención de nanopartículas de seda regenerada por precipitación en MeOH

Sobre 5 g de [BMIM]Cl fundido a 90°C en un recipiente resistente a los ultrasonidos y a la temperatura elevada, se adicionaron de forma secuencial pequeños fragmentos de fibroína
25 (seda lavada) hasta alcanzar los 750 mg. Después de cada adición se sometió la mezcla a una ultrasonificación pulsante de $285 \mu\text{m}$ de amplitud, con un ultrasonicador Branson 450 con control de temperatura máxima a 100°C hasta la completa disolución. La disolución completa de la fibroína requiere aproximadamente 12 minutos. A la mezcla se adicionaron $1200 \mu\text{L}$ de agua ultrapura (MilliQ $18.2\text{M}\Omega \cdot \text{cm}$) para rebajar la viscosidad. Se dejó enfriar
30 hasta 45°C y se hizo gotear lentamente (1 gota/2s) sobre un erlenmeyer con 100mL de MeOH enfriado a -20°C manteniendo una fuerte agitación (2300 rpm). Se observó la aparición de una suspensión blanca de aspecto lechoso. La suspensión se dejó que alcanzara temperatura ambiente manteniendo la agitación durante 2 horas, se transfirió a viales de centrifuga y se centrifugó a 12.000g , durante 15 minutos a 4°C . Se separó el
35 sobrenadante y se reservó para el posterior reciclaje del IL. Se adicionó un volumen igual de

MeOH, se resuspendió el precipitado blanco mediante la agitación vigorosa en vortex durante 5 minutos en pulsos de 30 segundos y se sometió a ultrasonificación con pulsos de 30 segundos de 285 μm de amplitud, con un ultrasonicador Branson 450, con baño de agua fría. Se repitió la centrifugación en las mismas condiciones que en la etapa anterior y se reunieron ambos sobrenadantes para la recuperación del IL por eliminación del metanol/agua en rotavapor a 80 °C y 80 mbar. El precipitado blanco se sometió a sucesivos lavados con agua ultrapura (MilliQ 18.2M Ω ·cm) y ultrasonificación (pulsos de 30 segundos de 285 μm de amplitud durante 5 minutos en baño de agua fría), en proporción Agua/RSF 20:1, mediante la agitación en vortex, centrifugación a 12000g durante 30 minutos a 4 °C y decantación de sobrenadante, hasta que no se observó la aparición de precipitado de AgCl al adicionar AgNO₃ sobre el agua de lavado. Una vez finalizado el lavado con agua Milli-Q, las partículas se resuspendieron en la mínima cantidad de agua, se congelaron a -20°C y se llevó a cabo la liofilización de las mismas en un liofilizador Edwards durante 72h a -55 °C y 0.5 mbar, obteniendo 600 mg de partículas secas (80% de rendimiento). Las partículas se caracterizaron midiendo la distribución de tamaños y se descartó la presencia de líquido iónico en las partículas empleando espectroscopía infrarroja. El grado de integridad de las proteínas se comprobó mediante electroforesis en gel de poliacrilamida en condiciones desnaturizantes.

20 *Medida del tamaño las partículas mediante Dispersión Dinámica de Luz (Dynamic Light Scattering ó DLS)*

Para obtener la distribución del tamaño de partículas en suspensión acuosa, se empleó la técnica de DLS con un Malvern Mastersizer2000E. En la **figura 1** se muestra el efecto de la ultrasonificación en el tamaño de las partículas. Así se pueden observar las distribuciones de tamaños de partículas, obtenidas a partir de soluciones de fibroína de seda disuelta en cloruro de 1-butil-3-metil-imidazolio ([BMIM]Cl) y precipitadas en metanol con diferentes tiempos de ultrasonificación en la etapa de lavado de las partículas para eliminar el líquido iónico en primer lugar y el metanol a continuación, observándose que, a igualdad de procedimiento de disolución y precipitación, a partir de un minuto de ultrasonificación, en la etapa de lavado con metanol se obtienen nanopartículas con una distribución del tamaño similar a la obtenida por precipitación de una disolución de fibroína disuelta en mezcla ternaria CaCl₂/EtOH/H₂O y precipitada en metanol (Z. Cao, *et al.* The preparation of regenerated silk fibroin microspheres. *Soft Matter*, 3 (2007) 910-915).

35 Tal y como puede observarse en la **figura 1**, para el caso de fibroína disuelta en [BMIM]Cl, las partículas precipitadas a partir de la solución en líquidos iónicos tienen tamaño variable

en función del tratamiento posterior a la precipitación. Las partículas sin tratar con ultrasonicación presentaron tamaños con diámetros comprendidos entre 1 y 10 μm , y con un tamaño más abundante de 2 μm . Las partículas sometidas a ultrasonicación durante tiempos superiores a 1 minuto (pulsos de 30s de 285 μm de amplitud) presentaron tamaños comprendidos entre 35 y 125 nm, con tamaño más abundante de 65 nm. Tiempos superiores a 5 minutos producen partículas nanométricas de tamaños comprendidos entre 20 y 35 nm pero ensanchando la curva de distribución de tamaños. Tratamientos de 5 y 15 minutos conducen al mismo resultado en la distribución de tamaños como se observa en la **Figura 1**.

10

Caracterización de las partículas mediante espectroscopía infrarroja

Mediante FTIR, en pastilla de KBr en un Perkin Elmer Spectrum 100 IR, se caracterizaron tanto las partículas de fibroína precipitadas a partir de la solución de [BMIM]Cl, como el líquido iónico empleado como disolvente, es decir, [BMIM]Cl, con el fin de asegurar que las partículas obtenidas no estuvieran contaminadas con el líquido iónico. En la **Figura 2** se muestran los espectros de infrarrojo correspondientes al líquido iónico puro [BMIM]Cl (A), de las partículas obtenidas mediante precipitación en Metanol de la disolución de fibroína en [BMIM]Cl (B), y de partículas obtenidas mediante la precipitación en MeOH de la disolución de fibroína en $\text{CaCl}_2/\text{EtOH}/\text{H}_2\text{O}$ (C).

20

Tal y como puede observarse, los espectros muestran las bandas características de la fibroína cristalina insoluble en agua o seda tipo II (β -Sheet) a 1627.4, 1516.0 y 1230.5 cm^{-1} , equivalentes a las que aparecen en partículas de seda obtenidas por el método de Cao (Z. Cao, *et al.* The preparation of regenerated silk fibroin microspheres. *Soft Matter*, 3 (2007) 910-915.) Se constata que las partículas obtenidas a partir de las soluciones de fibroína en líquidos iónicos carecen de las señales típicas del líquido iónico puro, lo que demuestra que no queda líquido iónico presente en dichas partículas y que las etapas de lavado son suficientes.

Caracterización de los péptidos en disolución mediante SDS-PAGE

Se realizó la comparación de la distribución de tamaños moleculares, cuando se usan para la disolución de la fibroína los métodos de disolución más comunes y cuando se utiliza la disolución en [BMIM]Cl, mediante la Electroforesis en gel de Poliacrilamida en condiciones desnaturizantes (SDS-PAGE Amersham ECL Gel 4-20%, GE Healthcare). En la **Figura 3** se pueden observar los patrones de electroforesis de las soluciones de fibroína de seda pura disuelta en diferentes medios. El procesado de la fibroína de seda en la mezcla ternaria

35

o en LiBr 9.3M producen degradación de la proteína que se traduce en un conjunto continuo de tamaños. En la disolución en líquidos iónicos la degradación es menor y aun es más clara en el caso de la disolución de capullos completos de seda, donde se observan las bandas correspondientes a la cadena pesada de la fibroína, las sericinas, y la cadena ligera de la fibroína, confirmadas mediante aislamiento de las bandas, digestión con tripsina e identificación en HPLC/MS empleando el software Proteome Discover 1.3 realizando la búsqueda en la Base de Datos SwissProt (2011). (Tolerancia de búsqueda: 1.5Da para el precursor y 0.8 Da para fragmentos) y aplicando un filtro: FDR $p < 0.01$ (Péptidos de alta confianza) y al menos dos péptidos por proteína.

10

Ejemplo 2. Disolución de capullos de seda completos en cloruro de 1-etil-3-metil imidazolio ([EMIM]Cl) y obtención de micropartículas de fibroína regenerada por precipitación en MeOH

Sobre 5 g de [EMIM]Cl fundido a 90°C en un recipiente resistente a los ultrasonidos y a la temperatura elevada, se adicionaron de forma secuencial pequeños fragmentos de capullos de seda hasta alcanzar los 750 mg. Después de cada adición se sometió la mezcla a una ultrasonicación pulsante de 285 μm de amplitud con un ultrasonicador Branson 450 con control de temperatura máxima a 100°C hasta la completa disolución. La disolución completa de la seda requiere aproximadamente 15 minutos. A la mezcla se adicionaron 1600 μL de agua ultrapura (MilliQ 18.2M Ω ·cm) para rebajar la viscosidad. Se dejó enfriar hasta 45 °C y se hizo gotear lentamente (1 gota/2s) sobre un erlenmeyer con 100mL de MeOH enfriado a -20 °C manteniendo una fuerte agitación (2300 rpm). Se observó la aparición de una suspensión blanca de aspecto lechoso. La suspensión se dejó que alcanzara temperatura ambiente manteniendo la agitación durante 2 horas, se transfirió a viales de centrifuga y se centrifugó a 12.000g, durante 15 minutos a 4 °C. Se separó el sobrenadante y se reservó para el posterior reciclaje del IL. Se adicionó un volumen igual de MeOH, se resuspendió el precipitado blanco mediante la agitación vigorosa en vortex durante 5 minutos en pulsos de 30 segundos. Se repitió la centrifugación en las mismas condiciones que en la etapa anterior y se reunieron ambos sobrenadantes para la recuperación del IL por eliminación del metanol/agua en rotavapor a 80 °C y 80 mbar. El precipitado blanco se sometió a sucesivos lavados con agua ultrapura (MilliQ 18.2M Ω ·cm) en proporción Agua/RSF 20:1, mediante la agitación en vortex, centrifugación a 12000g durante 30 minutos a 4 °C y decantación de sobrenadante, hasta que no se observó la aparición de precipitado de AgCl al adicionar AgNO₃ sobre el agua de lavado. Una vez finalizado el lavado con agua Milli-Q, las partículas se resuspendieron en la mínima cantidad de agua, se congelaron a -20°C y se llevó a cabo la liofilización de las mismas en un

35

liofilizador Edwards durante 72h a -55 °C y 0.5 mbar, obteniendo 415 mg de partículas secas (55% de rendimiento). El rendimiento es inferior al ejemplo en el que se disuelve directamente fibroína porque el capullo completo contiene sericina que se pierde en las etapas de lavado.

5

Para obtener la distribución del tamaño de partículas en suspensión acuosa, se empleó la técnica de Dynamic Light Scattering con un Malvern Mastersizer2000E observándose en la distribución de tamaño de partículas, que el 80% de las partículas se encuentran entre 1.227 μm (Percentil 10) y 4.037 μm (Percentil 90), con Percentil 50 para un diámetro de 1.964 μm , y un área superficial específica de 0.604 m^2/g .

10

Mediante FTIR, en pastilla de KBr en un Perkin Elmer Spectrum 100 IR, se caracterizaron tanto las partículas de fibroína precipitadas a partir de la solución de [EMIM]Cl, como el líquido iónico empleado como disolvente, es decir, [EMIM]Cl, con el fin de asegurar que las partículas obtenidas no estuvieran contaminadas con el líquido iónico. El espectro muestra las bandas características de la fibroína cristalina insoluble en agua o seda tipo II (β -Sheet) a 1629.9, 1516.9 y 1231.6 cm^{-1} , equivalentes a las que aparecen en partículas de seda obtenidas por el método de Cao (Z. Cao, *et al.* The preparation of regenerated silk fibroin microspheres. *Soft Matter*, 3 (2007) 910-915.) Se constata que las partículas obtenidas a partir de las soluciones de fibroína en líquidos iónicos carecen de las señales típicas del líquido iónico puro, lo que demuestra que no queda líquido iónico presente en dichas partículas y que las etapas de lavado son suficientes.

15

20

Se realizó la comparación de la distribución de tamaños moleculares, cuando se usan para la disolución de la fibroína los métodos de disolución más comunes y cuando se utiliza la disolución en [EMIM]Cl, mediante la Electroforesis en gel de Poliacrilamida en condiciones desnaturizantes (SDS-PAGE Amersham ECL Gel 4-20%, GE Healthcare). De forma análoga a la disolución en el [BMIM]Cl que aparece en la **Figura 3** con el [EMIM]Cl se reproducen los mismos patrones de electroforesis de las soluciones de seda de capullos disueltos en diferentes medios. El procesado de la fibroína de seda en la mezcla ternaria o en LiBr 9.3M producen degradación de la proteína que se traduce en un conjunto continuo de tamaños. En la disolución en líquidos iónicos la degradación es menor y aun es más clara en el caso de la disolución de capullos completos de seda, donde se observan las bandas correspondientes a la cadena pesada de la fibroína, las sericinas, y la cadena ligera de la fibroína, confirmadas mediante aislamiento de las bandas, digestión con tripsina e identificación en HPLC/MS empleando el software Proteome Discover 1.3 realizando la

30

35

búsqueda en la Base de Datos SwissProt (2011). (Tolerancia de búsqueda: 1.5 Da para el precursor y 0.8 Da para fragmentos) y aplicando un filtro: FDR $p < 0.01$ (Péptidos de alta confianza) y al menos dos péptidos por proteína.

5

10

15

20

25

30

35

REIVINDICACIONES

1. Procedimiento para la disolución de fibroína caracterizado porque comprende:
 - a) Mezclar la fibroína con un líquido iónico fundido a temperatura inferior a 100°C, y
 - b) Aplicar pulsos de ultrasonidos de alta potencia sobre la mezcla obtenida en a), hasta la obtención de una disolución homogénea de fibroína en el líquido iónico.
2. Procedimiento según la reivindicación 1 donde el líquido iónico está compuesto por un catión orgánico, que se selecciona de entre imizadolio, piridinio, pirimidinio, pirazinio, pirazolio, oxazolio, 1,2,3, triazolio, trozolio, piperidinio, pirrolidinio, quinolinio, isoquinilio y alquilamonio, preferiblemente imidazolio y, un anión que se selecciona de entre un haluro, perborato, pseudohaluro, y carboxilatos C1-C6, preferiblemente haluro.
3. Procedimiento según la reivindicación 1 donde la proporción de líquido iónico/fibroína está comprendida entre 99:1-70:30, preferiblemente 90:10.
4. Procedimiento según la reivindicación 1 donde los pulsos de ultrasonido presentan una amplitud máxima comprendida entre 21µm y 494µm, elevando la temperatura de la mezcla hasta 80-150°C.
5. Procedimiento, según la reivindicación 1, que comprende opcionalmente:
 - c. Añadir agua para disminuir la viscosidad de la disolución obtenida en b).
6. Procedimiento para la obtención de partículas de fibroína regenerada caracterizado porque comprende los siguientes pasos:
 - i. Obtención de una disolución homogénea de fibroína en líquido iónico según el método de cualquiera de las reivindicaciones 1-5,
 - ii. Enfriamiento de la disolución obtenida en i) hasta una temperatura comprendida entre 30 y 65°C, preferiblemente 45°C,
 - iii. Dispersión de la disolución obtenida en ii) en un disolvente precipitante mantenido en agitación vigorosa,
 - iv. Separación de las partículas de fibroína regenerada en forma sólida formadas en iii) de la disolución del disolvente precipitante conteniendo el líquido iónico,
 - v. Lavado de las partículas de fibroína regenerada separadas en iv) con agua destilada, desionizada o ultrapura, y
 - vi. Secado de las partículas de fibroína regenerada lavadas en v).

7. Procedimiento según la reivindicación 6 donde las partículas de fibroína regenerada obtenidas presentan tamaños micro y/o nanométricos.
8. Procedimiento según la reivindicación 6 donde la agitación en iii) se mantiene durante un periodo comprendido entre 1-24 horas, preferiblemente 2 horas.
- 5 9. Procedimiento, según la reivindicación 6, donde la proporción en peso entre el disolvente precipitante y la solución de fibroína en líquido iónico se encuentra comprendida entre 70:30 y 95:5.
- 10 10. Procedimiento, según la reivindicación 6, donde el disolvente precipitante empleado en iii) se selecciona de entre metanol, etanol, isopropanol, acetona, acetonitrilo, agua, DMSO, THF y combinaciones de los mismos.
11. Procedimiento, según la reivindicación 6, donde el disolvente precipitante se encuentra a una temperatura entre su punto de fusión y 4°C.
12. Procedimiento según la reivindicación 6 donde la técnica de separación empleada en el paso iv) se selecciona de entre centrifugación, filtración y uso de
15 membranas.
13. Procedimiento según la reivindicación 12 donde la técnica de separación empleada es centrifugación a 12000 g.
14. Procedimiento según la reivindicación 6 donde el líquido iónico disuelto en el disolvente precipitante en iv) se recupera para su reutilización.
- 20 15. Procedimiento, según la reivindicación 14, donde el líquido iónico se recupera mediante destilación a vacío.
16. Procedimiento, según la reivindicación 6, donde se aplica ultrasonificación durante la etapa v) de lavado.
- 25 17. Procedimiento, según la reivindicación 6, donde el secado se lleva a cabo por liofilización a una temperatura comprendida entre -20°C y -80°C y a una presión de vacío comprendida entre 10^{-4} bar y 5×10^{-2} bar.
18. Partículas de fibroína regenerada obtenidas por el procedimiento de las reivindicaciones 6-17.

30

35

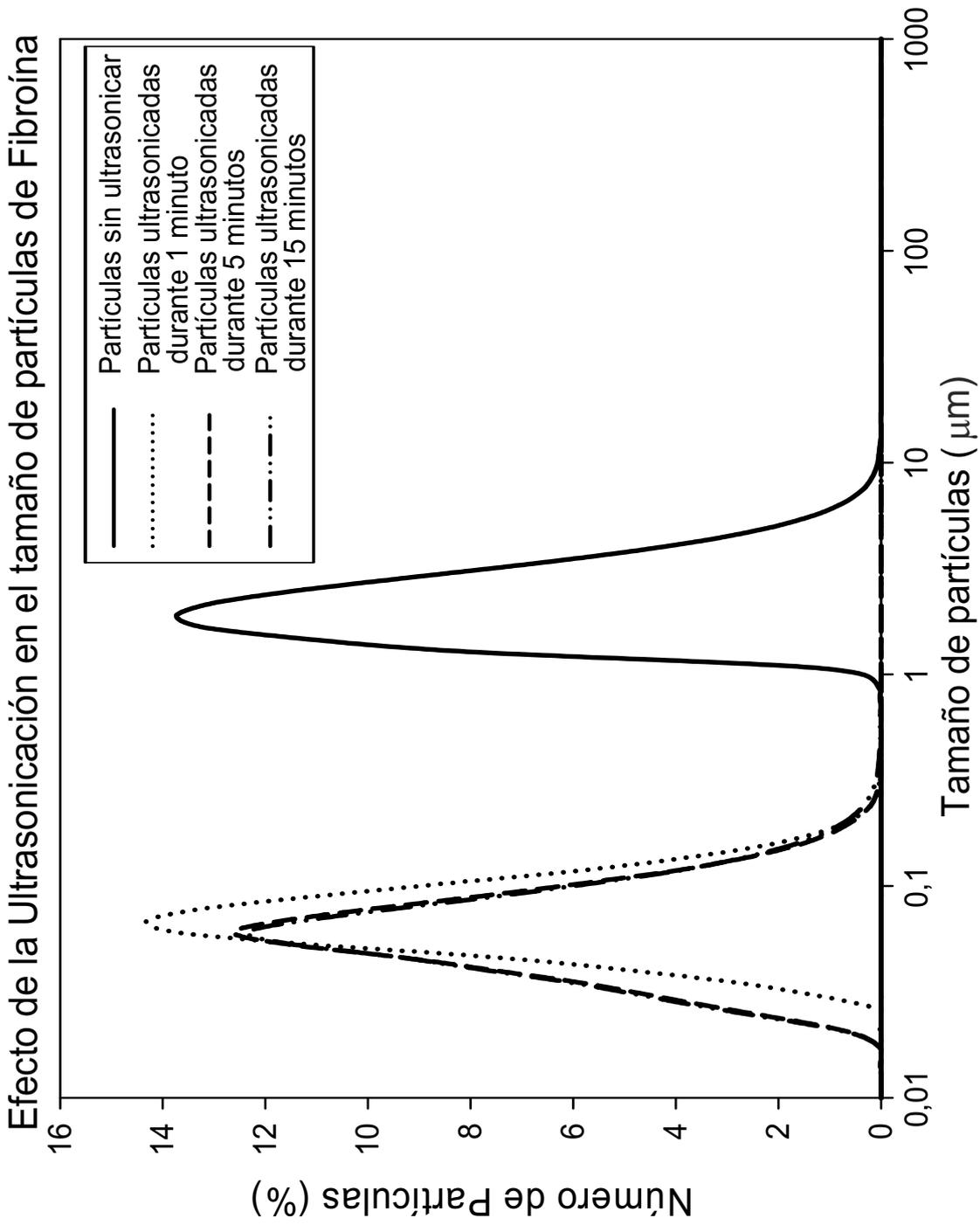


FIG. 1

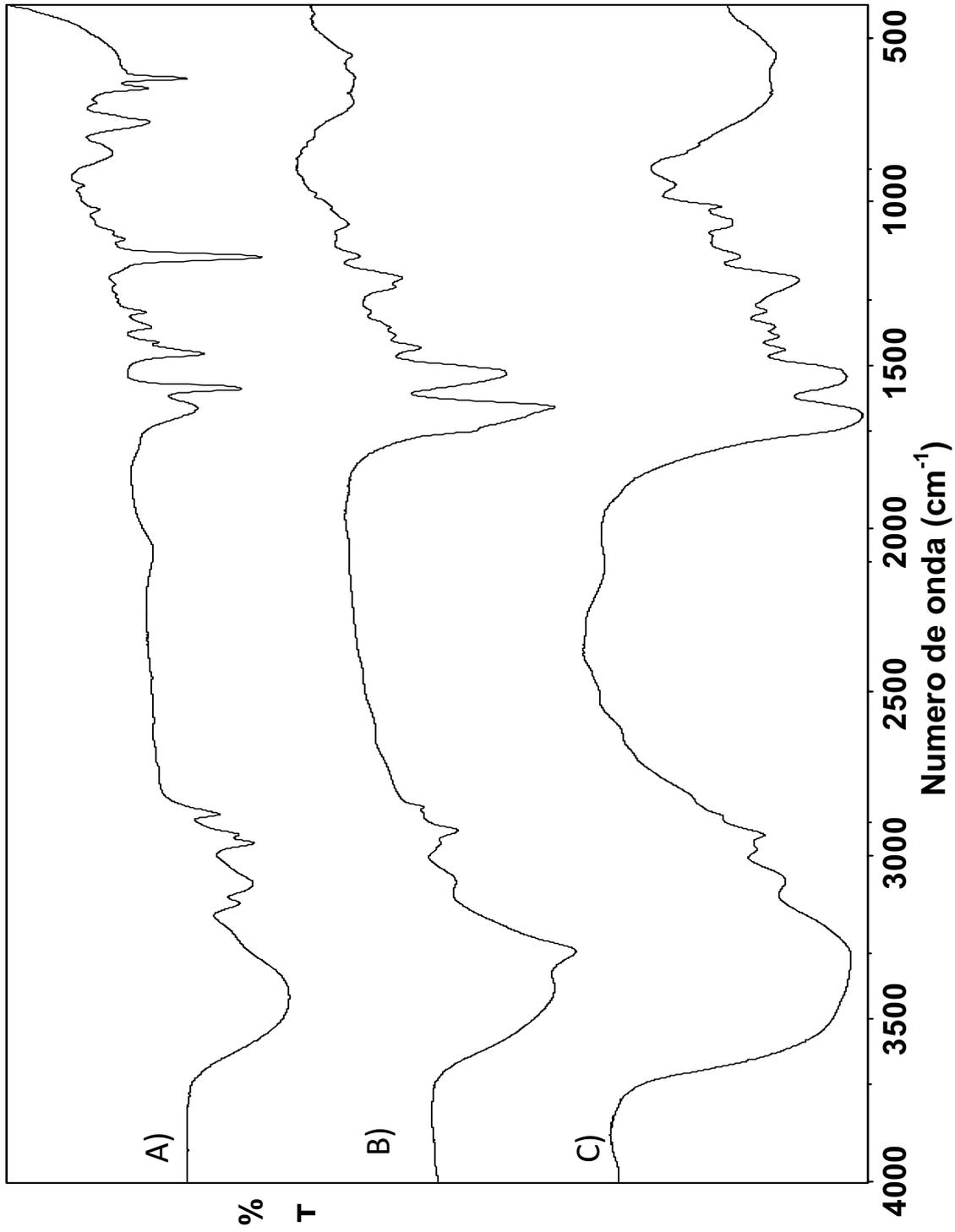


FIG. 2

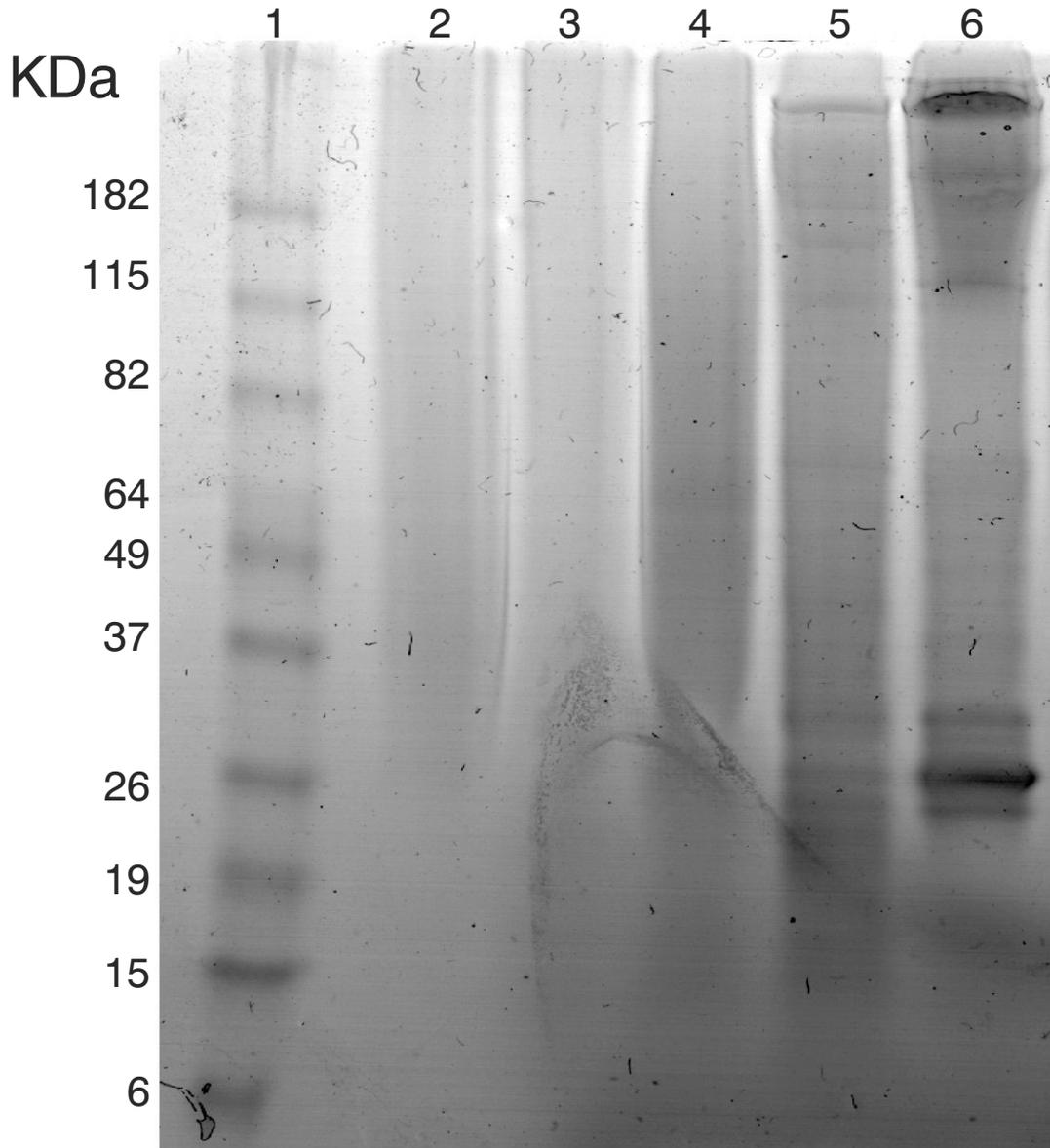


FIG. 3



- ②① N.º solicitud: 201330095
 ②② Fecha de presentación de la solicitud: 28.01.2013
 ③② Fecha de prioridad:

INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TECNICA

⑤① Int. Cl.: **C07K14/435** (2006.01)
A61L27/22 (2006.01)

DOCUMENTOS RELEVANTES

Categoría	⑤⑥ Documentos citados	Reivindicaciones afectadas
X	WO 2011056924 A2 (THE BOARD OF TRUSTEES OF THE UNIVERSITY OF ALABAMA) 12.05.2011, reivindicaciones 2,16.	1-4
Y	US 20090051068 A1 (BRAUER, S. et al.) 26.02.2009, párrafos [0005],[0031],[0037]; ejemplo 3.	1-18
Y	US 7671178 B1 (PHILLIPS, D.M. et al.) 02.03.2010, ejemplos.	1-18
Y	LEE, S.H. et al. "Preparation of biopolymer-based materials using ionic liquids for the biomedical applications". En: Ionic Liquid Applications: Pharmaceuticals, Therapeutics, and Biotechnology. Editado por S. Malhotra. ACS Symposium Series. American Chemical Society. 2010, Vol. 1038, capítulo 10, páginas 115-134, todo el documento.	1-18

Categoría de los documentos citados

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

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

El presente informe ha sido realizado

para todas las reivindicaciones

para las reivindicaciones nº:

Fecha de realización del informe
26.02.2014

Examinador
M. Novoa Sanjurjo

Página
1/4

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

C07K, A61L

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

INVENES, EPODOC, BIOSIS, HCAPLUS, GOOGLE

Fecha de Realización de la Opinión Escrita: 26.02.2014

Declaración

Novedad (Art. 6.1 LP 11/1986)	Reivindicaciones 6-18	SI
	Reivindicaciones 1-5	NO
Actividad inventiva (Art. 8.1 LP11/1986)	Reivindicaciones	SI
	Reivindicaciones 1-18	NO

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

Base de la Opinión.-

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

Consideraciones:

La invención consiste en un procedimiento para disolver la fibroína de la seda, que consiste en disolver la fibroína en un líquido iónico y someter la disolución a sonicación. La fibroína disuelta, se regenera por un procedimiento en el que se utiliza metanol como disolvente precipitante.

1. Documentos considerados.-

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

Documento	Número Publicación o Identificación	Fecha Publicación
D01	WO 2011056924 A2 (THE BOARD OF TRUSTEES OF THE UNIVERSITY OF ALABAMA)	12.05.2011
D02	US 20090051068 A1 (BRAUER, S. et al.)	26.02.2009
D03	US 7671178 B1 (PHILLIPS, D.M. et al.)	02.03.2010
D04	LEE, S.H. et al. "Preparation of biopolymer-based materials using ionic liquids for the biomedical applications". En: Ionic Liquid Applications: Pharmaceuticals, Therapeutics, and Biotechnology. Editado por S. Malhotra. ACS Symposium Series. American Chemical Society. 2010, Vol. 1038, capítulo 10, páginas 115-134.	

El documento D01, describe un método para disolver polímeros tanto naturales (almidón, pectina, seda, colágeno, etc.) como sintéticos (polietilenglicol, polietilamina) que consiste en mezclar los polímeros en líquidos iónicos y después conseguir la disolución por medio de calor, agitación, radiación microondas o sonicación.

El documento D02, describe un método para obtener fibroína en el que la fibroína se disuelve en cloruros de 1,3-dialquilimidazolío y se regenera por tratamiento con metanol.

El documento D03, describe un método similar para solubilizar y regenerar fibroína con distintos líquidos iónicos. Los ejemplos ilustran el procedimiento en el que la fibroína se disuelve con ayuda de radiación microondas y se regenera con metanol.

El documento D04, describe la preparación de biomateriales derivados de biopolímeros que se obtienen disolviendo éstos en líquidos iónicos. En el caso de que el polímero sea celulosa, la mezcla se somete a sonicación y la disolución se completa en pocos minutos.

2. Declaración motivada según los artículos 29.6 y 29.7 del Reglamento de ejecución de la Ley 11/1986, de 20 de marzo, de Patentes sobre la novedad y la actividad inventiva; citas y explicaciones en apoyo de esta declaración**NOVEDAD****Reivindicaciones 1-5**

Los métodos para disolver polímeros utilizando líquidos iónicos como disolventes, están ampliamente descritos en el estado de la técnica en los documentos D01-D04. El documento D01, menciona la posibilidad de que, entre otros, el polímero sea fibroína de la seda y que se complete la disolución con sonicación (ver reivindicaciones 2 y 16). Se considera que las reivindicaciones 1-5 no son nuevas y no cumplen los requisitos del Artículo 6 de la Ley de Patentes 11/1986.

Reivindicaciones 6-18

No se ha encontrado descrito en el estado de la técnica, un procedimiento para obtener fibroína en el que después de disolverla en un líquido iónico sometiendo la mezcla a sonicación, se regenera posteriormente la fibroína precipitándola con metanol. Las reivindicaciones 6-18, son nuevas de acuerdo al Artículo 6 de la Ley de Patentes 11/1986.

ACTIVIDAD INVENTIVA**Reivindicaciones 6-18**

Las tres partes fundamentales del procedimiento de obtención de fibroína de la invención son: a) disolución de la fibroína en un líquido iónico, b) sonicación para completar la disolución y c) precipitación con metanol para obtener la fibroína regenerada. Los documentos D02 y D03, describen procedimientos para disolver la fibroína de la seda en líquidos iónicos como los incluidos en la presente solicitud, en los que la etapa de regeneración de la fibroína disuelta, se completa con precipitación con metanol. No se ha encontrado en el estado de la técnica un procedimiento como los descritos en los documentos D02 y D03, en el que la disolución de fibroína en el líquido iónico, se complete con sonicación de la mezcla; aún así, se ha descrito en el documento D04 (página 119, párrafo 2), que en un procedimiento de solubilización de celulosa en [Bmim][Cl], al incluir una etapa de sonicación posterior, se consigue la disolución completa de la celulosa en pocos minutos. Se considera que un experto en la materia podría intentar aplicar la sonicación descrita en el documento D04 a los métodos de los documentos D01-D03 con una expectativa razonable de éxito, para conseguir la disolución completa de la fibroína en el líquido iónico en poco tiempo; por ello se considera que las reivindicaciones 6-18, carecen de actividad inventiva y no cumplen el Artículo 8 de la Ley de Patentes 11/1986.