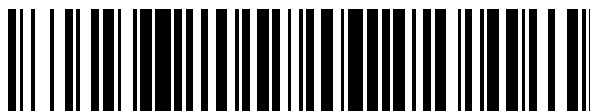


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 527 125**

51 Int. Cl.:

A61K 9/64

(2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **29.05.2008** **E 08756432 (4)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **01.10.2014** **EP 2211876**

54 Título: **Método para la gelificación de fibroína de seda usando sonicación**

30 Prioridad:

29.05.2007 US 940554 P

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

20.01.2015

73 Titular/es:

**TRUSTEES OF TUFTS COLLEGE (100.0%)
BALLOU HALL
MEDFORD, MA 02155, US**

72 Inventor/es:

**WANG, XIAOQIN;
KLUGE, JON;
LEISK, GARY G. y
KAPLAN, DAVID L.**

74 Agente/Representante:

DE ELZABURU MÁRQUEZ, Alberto

ES 2 527 125 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

Método para la gelificación de fibroína de seda usando sonicación

Campo de la invención

5 Esta invención proporciona métodos para formar rápidamente gelificación de fibroína de seda mediante ultrasonificación. Los hidrogeles formados a partir del método son útiles, por ejemplo, como vehículos de bioentrega.

Antecedentes

10 Los hidrogeles poliméricos biocompatibles y biodegradables son vehículos útiles para entregar moléculas bioactivas y células para aplicaciones biomédicas, tal como en ingeniería de tejidos y liberación controlada de fármacos. La fibroína de seda nativa purificada forma estructuras de hidrogel reticuladas ricas en láminas β a partir de una disolución acuosa, siendo los detalles del proceso y las propiedades del gel influenciados por parámetros del entorno. Los tiempos de gelificación previos a menudo llevan días a semanas para disoluciones acuosas de proteínas de seda nativas, siendo la alta temperatura y bajo pH responsables de aumentar la cinética de la gelificación. Esas condiciones, aunque adecuadas para la incorporación de algunas moléculas bioactivas, pueden ser demasiado lentas para la incorporación de células activas y moléculas bioactivas lábiles.

15 Por tanto, hay una necesidad en la técnica de un procedimiento para formar rápidamente gelificación de fibroína de seda en condiciones fisiológicas suaves.

Compendio de la invención

20 Esta invención se refiere a un procedimiento para formar rápidamente gelificación de fibroína de seda. El procedimiento expone fibroína de seda a un tratamiento que comprende ultrasonificación durante un periodo de tiempo suficiente para iniciar la gelificación. Por ejemplo, bajo condiciones particulares, la gelificación se produce dentro de 24 horas del tratamiento de ultrasonificación.

25 Una realización de la invención también se refiere a un método para controlar el tiempo de gelificación de la fibroína de seda poniendo en contacto una disolución de fibroína de seda con un tratamiento de ultrasonificación durante un periodo de tiempo suficiente para iniciar la gelificación. En un ejemplo, el tiempo de gelificación está por debajo de dos horas.

30 Otra realización se refiere a un método para encapsular un agente en fibroína de seda. El método comprende exponer una disolución de fibroína de seda a un tratamiento de ultrasonificación durante un periodo de tiempo para iniciar la gelificación, e introducir el agente en la disolución de fibroína de seda antes de que se produzca una gelificación sustancial en la disolución de fibroína de seda, formando de este modo un agente encapsulado en la fibroína de seda. Alternativamente, el agente se puede añadir a la fibroína de seda antes de la sonicación. El agente puede ser un agente terapéutico, tal como un fármaco, o un material biológico, tal como una célula. Por ejemplo, se incorporaron con éxito células madre mesenquimales derivadas de médula ósea humana (hMSCs) en hidrogeles de fibroína de seda después de la sonicación, seguido de gelificación rápida y función celular sostenida.

35 Los hidrogeles que resultan de los métodos de la invención exhiben tanto buenas propiedades mecánicas como perfiles de degradación proteolítica. Por ejemplo, disoluciones a 4%, 8% y 12% (p/v) de fibroína de seda sonicadas, seguido de añadir hMSCs, se gelificaron en 0,5 horas a 2 horas. Las células crecieron y proliferaron en los geles al 4% a lo largo de veintidós días. Adicionalmente, se pueden usar concentraciones de K^+ bajas y pH bajo para promover la gelificación.

Descripción de los dibujos

40 La Figura 1 representa la gelificación de fibroína de seda (FS) bajo diversas condiciones de sonicación. Se usaron 0,5 ml de disolución acuosa, la sonicación se realizó a 20% de amplitud y el tiempo varió de 5 s a 30 s. Los valores son media $\pm$ desviación estándar de un mínimo de $N = 3$ muestras para cada grupo. * Diferencias significativas entre los grupos (test t de Student, $p < 0,01$).

45 Las Figuras 2A-2C representan la formación dinámica de la estructura de láminas β de la seda durante el proceso de gelificación. La Fig. 2A muestra medidas de Dicroísmo Circular (DC) en disoluciones acuosas de fibroína de seda al 2% (p/v) sonicadas, con barridos de longitudes de onda tomados cada 8 min después de la sonicación durante 120 min. La Fig. 2B muestra una gráfica del aumento de la elipticidad a 217 nm (pico de estructura de láminas β) registrado frente al tiempo. La Fig. 2C es una ilustración esquemática del mecanismo de gelificación de la seda. El proceso de gelificación contiene dos etapas cinéticas, (a) cambio estructural de espiral aleatoria a lámina β , produciéndose algunas reticulaciones físicas inter-cadena en un marco de tiempo corto; (b) estructura de láminas β extendida, gran cantidad de reticulaciones de lámina β inter-cadena formadas, y moléculas organizadas hasta una red de gel a lo largo de un marco de tiempo relativamente largo.

Las Figuras 3A-3C muestran los efectos de la sal y el pH sobre la gelificación de fibroína de seda. Antes de la sonicación, se suplementaron disoluciones a diversas concentraciones con K^+ (Fig. 3A) y Ca^{2+} (Fig. 3B) hasta

concentraciones finales de 20 mM-200 mM. La Fig. 3C muestra los efectos de ajustar el pH de la disolución acuosa de fibroína de seda antes de la sonicación. La sonicación se realizó a 20% de amplitud durante 15 s para todas las muestras. Los valores son media $\pm$ desviación estándar de un mínimo de $N = 3$ muestras para cada grupo. *, $\diamond$ Diferencias significativas entre los grupos (test t de Student, $p < 0,05$).

Las Figuras 4A-4C presentan gráficas que analizan las propiedades mecánicas de hidrogeles de fibroína de seda. La Figura 4A representa el límite elástico (kPa) de geles de fibroína de seda (eje y) a concentraciones variadas, 4%, 8% y 12% (eje x) bajo condiciones de 30 Amp, 40 Amp o 50 Amp. La Figura 4B representa el módulo elástico tradicional (kPa) de geles de fibroína de seda (eje y) a concentraciones variadas, 4%, 8% y 12% (eje x) bajo condiciones de 30 Amp, 40 Amp o 50 Amp. La Figura 4C representa el módulo de equilibrio (kPa) de geles de fibroína de seda (eje y) a concentraciones variadas, 4%, 8% y 12% (eje x).

La Figura 5 representa la degradación enzimática de hidrogeles de fibroína de seda. Se prepararon por sonicación hidrogeles a 4%, 8% y 12% (p/v) y se sumergieron en PBS, pH 7,4 (control) o bien proteasa XIV en PBS (5 U/ml) durante siete días. La masa que quedó se determinó comparando el peso húmedo de trozos de gel en cada punto de tiempo con el peso húmedo original. Los valores son media $\pm$ desviación estándar de un mínimo de $N = 4$ muestras.

La Figura 6 representa gráficamente la cuantificación de ADN de hMSCs encapsuladas en hidrogeles de fibroína de seda. El contenido de ADN en cada grupo de gel se analizó con el ensayo PicoGreen, y los resultados se normalizaron mediante el peso húmedo de cada trozo de gel. Los valores son media $\pm$ desviación estándar de un mínimo de $N = 4$ muestras. * Diferencias significativas entre los grupos (test t de Student, $p < 0,05$).

Descripción detallada

Debe entenderse que esta invención no está limitada a la metodología, protocolos, y reactivos, etc. particulares descritos en la presente memoria, y como tal pueden variar. La terminología empleada en la presente memoria es para el fin de describir realizaciones particulares solamente, y no pretende limitar el alcance de la presente invención, que es definida únicamente por las reivindicaciones.

Como se emplean en la presente memoria y en las reivindicaciones, las formas singulares incluyen la referencia plural y viceversa, a menos que el contexto indique claramente lo contrario. Aparte de en los ejemplos de operación, o donde se indique lo contrario, todos los números que expresan cantidades de ingredientes o condiciones de reacción empleados en la presente memoria deben entenderse como modificados en todos los casos por el término "aproximadamente".

Todas las patentes y otras publicaciones identificadas se incorporan expresamente en la presente memoria por referencia para el fin de describir y revelar, por ejemplo, las metodologías descritas en tales publicaciones que se podrían usar en conexión con la presente invención. Estas publicaciones se proporcionan únicamente por su descripción antes de la fecha de presentación de la presente solicitud. Nada a este respecto debe ser interpretado como una admisión de que los inventores no están autorizados a anteceder tal descripción en virtud de invención anterior o por cualquier otra razón. Todas las declaraciones en cuanto a las fechas o representación en cuanto a los contenidos de estos documentos están basadas en la información disponible para los solicitantes, y no constituyen ninguna admisión en cuanto a la exactitud de las fechas o contenidos de estos documentos.

A menos que se defina lo contrario, todos los términos técnicos y científicos empleados en la presente memoria tienen el mismo significado que los entendidos comúnmente por un experto habitual en la técnica a la que esta invención pertenece. Aunque se pueden usar cualesquiera métodos, dispositivos y materiales conocidos en la práctica o ensayo de la invención, los métodos, dispositivos y materiales a este respecto se describen en la presente memoria.

Esta invención se refiere a un procedimiento para formar rápidamente gelificación de fibroína de seda. El procedimiento expone fibroína de seda a un tratamiento que comprende ultrasonificación durante un periodo de tiempo suficiente para iniciar la gelificación. Esta estrategia proporciona métodos basados en ultrasonificación usados para acelerar la transición sol-gel de una manera temporalmente controlable. El tiempo de gelificación puede ser controlado desde minutos hasta horas en base a los parámetros de sonicación usados (energía de salida, duración de tiempo, y otros) y la concentración de fibroína de seda, dentro de condiciones fisiológicamente relevantes. Después de la sonicación, la fibroína de seda sufre un rápido cambio estructural de espiral aleatoria a lámina β , correspondiente a la gelificación. Se puede añadir un agente, por ejemplo un agente terapéutico o un agente biológico, antes, durante o bien después del tratamiento de sonicación, y ser encapsulado tras la gelificación. La presente invención proporciona por tanto métodos útiles para para diversas aplicaciones biomédicas, tales como aquellas en las que la encapsulación de células es sensible al tiempo.

Los hidrogeles se consideran andamios útiles para la encapsulación y entrega de células y moléculas bioactivas, tal como para ingeniería de tejidos y aplicaciones terapéuticas celulares, debido a su alto contenido en agua; usualmente $>30\%$ (Park & Lakes, BIOMATS: INTRO. (2ª ed., Plenum Press, NY, 1992). Los hidrogeles usados en estos tipos de aplicaciones tienen propiedades mecánicas y estructurales similares a algunos tejidos y matrices extracelulares (MEC), por lo tanto, pueden ser implantados para la restauración de tejidos o la liberación local de

factores terapéuticos. Para encapsular y entregar células, los hidrogeles deben ser formados, preferiblemente, sin dañar las células, no deben ser tóxicos para las células y el tejido circundante, deben ser biocompatibles, tener una capacidad de transporte de masa adecuada para permitir la difusión de nutrientes y metabolitos, tener suficiente integridad y resistencia mecánica para resistir manipulaciones asociadas con la implantación, tener tiempos de vida controlables, y deben mantener el volumen de gel después de la implantación durante un periodo de tiempo razonable dependiendo de la aplicación (Drury & Mooney, 24 *Biomats.* 4337-51 (2003)).

Se han usado para formar hidrogeles diversos materiales sintéticos, tales como poli(óxido de etileno) (PEO), poli(alcohol vinílico) (PVA), poli(ácido acrílico) (PAA), poli(fumarato de propileno-co-etilenglicol) (P(PF-co-EG)), y materiales derivados naturalmente, tales como agarosa, alginato, chitosán, colágeno, fibrina, gelatina y ácido hialurónico (HA). La gelificación se produce cuando las cadenas de polímero se reticulan químicamente o bien físicamente en redes, desencadenadas por reactivos químicos (p.ej., reticuladores) o estimulantes físicos (p.ej., pH y/o temperatura). Los hidrogeles formados a partir de polímeros sintéticos ofrecen el beneficio de que la gelificación y las propiedades del gel son controlables y reproducibles, mediante el uso de pesos moleculares específicos, estructuras de bloques, y modos de reticulación. De manera general, la gelificación de polímeros derivados naturalmente es menos controlable, aunque tienden a ser útiles como vehículos de células y moléculas bioactivas para ingeniería de tejidos y dispositivos médicos implantables, porque sus propiedades macromoleculares están alineadas más estrechamente con la matriz extracelular y los productos de degradación no son tóxicos (Lee et al., 221 *Int'l J. Pharma.* 1-22 (2001); Smidsrød et al., 8 *Trends Biotech.* 71-78 (1990)).

Entre los biomateriales derivados naturalmente, se ha estudiado la proteína fibroína de seda, la proteína estructural auto-ensamblante en las fibras naturales del gusano de seda, debido a sus excelentes propiedades mecánicas, biocompatibilidad, velocidades de degradación controlables, y formación inducible de redes cristalinas estructurales de láminas β (Altman et al., 24 *Biomats.* 401-16 (2003); Jin & Kaplan, 424 *Nature* 1057-61 (2003); Horan et al., 26 *Biomats.* 3385-93 (2005); Kim et al., 26 *Biomats.* 2775-85 (2005); Ishida et al., 23 *Macromolecules* 88-94 (1990); Nazarov et al., 5 *Biomacromolecules* 718-26 (2004)). La fibroína de seda ha sido fabricada en diversos formatos materiales, que incluyen películas, andamios porosos tridimensionales, fibras electrohiladas y microesferas, tanto para ingeniería de tejidos como para aplicaciones de liberación controlada de fármacos (Jin et al., 5 *Biomacromolecules* 711-7 (2004); Jin et al., 3 *Biomacromolecules*, 1233-39 (2002); Hino et al., 266 *J. Colloid Interface Sci.* 68-73 (2003); Wang et al., 117 *J Control Release*, 360-70 (2007)). Véanse también las solicitudes de patente de EE.UU. con N° de serie 11/020.650; N° 10/541.182; N° 11/407.373; y N° 11/664.234; los documentos PCT/US07/020789; PCT/US08/55072.

En la naturaleza, se produce una disolución acuosa de fibroína de seda en la sección posterior de la glándula del gusano de seda, y se almacena después en la sección media en una concentración hasta 30% (p/v), y contiene un alto contenido de espiral aleatoria o estructura helicoidal alfa. Durante el hilado de las fibras en el aire, una alta fuerza de cizallamiento y un flujo elongacional inducen un autoensamblaje y una transición estructural a la estructura de láminas β , conduciendo a la formación de fibras sólidas (Vollrath & Knight, 410 *Nature*, 541-48 (2001)). La presencia de iones metálicos y cambios de pH en diferentes secciones de la glándula influyen en esta transición (Chen et al., 3 *Biomacromolecules* 644-8 (2002); Zhou et al., 109 *J. Phys. Chem. B* 16937-45 (2005); Dicko et al., 5 *Biomacromolecules* 704-10 (2004); Terry et al., 5 *Biomacromolecules* 768-72 (2004)). *In vitro*, las disoluciones acuosas de fibroína de seda purificadas sufren autoensamblaje hasta estructuras de láminas β y forman hidrogeles. Esta transición sol-gel es influida por la temperatura, el pH y la fuerza iónica (Wang et al., 36 *Int'l J. Biol. Macromol.* 66-70 (2005); Kim et al., 5 *Biomacromolecules* 786-92 (2004); Matsumoto et al., 110 *J. Phys. Chem. B* 21630-38 (2006)). La resistencia y módulo compresivos de los hidrogeles de seda aumentan con un aumento en la concentración de fibroína de seda y la temperatura (Kim et al., 2004).

Los hidrogeles de fibroína de seda son de interés para muchas aplicaciones biomédicas. Por ejemplo, se usaron hidrogeles de fibroína como biomaterial de relleno de huesos para curar defectos trabeculares de tamaño crítico de fémures distales de conejos, donde los geles de seda mostraron mejor curación del hueso que el material de control de poli(D,L lactida-glicolida) (Fini et al., 26 *Biomats.* 3527-36 (2005)).

Para muchas aplicaciones basadas en células, la gelificación debe ser inducida bajo condiciones suaves en un periodo de tiempo relativamente corto (en horas). El tiempo de gelificación de la seda puede ser prohibitivamente largo, sin embargo, a menos que se consideren tratamientos no fisiológicos (tales como pH bajo, alta temperatura, aditivos) en ausencia de modificaciones químicas en la proteína fibroína de seda nativa. Para concentraciones de fibroína de seda de 0,6% a 15% (p/v), se requirieron días a semanas para la transición sol-gel a temperatura ambiente o 37°C (Kim et al., 2004; Matsumoto et al., 2006; Fini et al., 2005)). Añadir sales a concentraciones por encima de niveles fisiológicos no altera significativamente la cinética de la gelificación (Kim et al., 2004). Disminuir el pH (pH<5) o aumentar la temperatura (>60°C) podría reducir el tiempo de gelificación a unas pocas horas (Kim et al., 2004; Fini et al., 2005; Motta et al., 15 *J. Biomater. Sci. Polymer. Edu.* 851-64 (2004)), pero estas condiciones podrían alterar potencialmente la función celular y afectar a la viabilidad celular.

En la presente invención, se llevan a cabo nuevos métodos para acelerar el proceso y controlar la gelificación de fibroína de seda mediante ultrasonificación. Más específicamente, se presenta un nuevo método basado en ultrasonificación que acelera la transición sol-gel de una manera temporalmente controlable. Mecánicamente, el procedimiento induce la reticulación física de láminas β por medio de una alteración en la hidratación hidrófoba de

las cadenas de la proteína fibroína. Esto permite las adiciones de células post-sonicación, seguido de gelificación rápida. El tiempo de gelificación puede ser controlado de minutos a horas en base a los parámetros de sonicación usados (energía de salida y duración de tiempo) y las concentraciones de fibroína de seda. El método proporciona además la manipulación de los efectos del pH y la concentración salina en la gelificación; los cambios estructurales dinámicos de la seda después de la gelificación; y el comportamiento de las células encapsuladas, tales como células madre mesenquimales derivadas de médula ósea humana (hMSCs) en los geles de seda.

Se puede usar cualquier tipo de fibroína de seda según la presente invención. La fibroína de seda producida por los gusanos de seda, tales como *Bombyx mori*, es la más común y representa una fuente renovable, respetuosa con el medio ambiente. Están disponibles en el mercado capullos orgánicos de gusanos de seda. Hay muchas sedas diferentes, sin embargo, que incluyen seda de araña, sedas transgénicas, sedas manipuladas por ingeniería genética, y variantes de las mismas, que se pueden usar alternativamente. Se puede preparar una disolución acuosa de fibroína de seda a partir de los capullos de gusanos de seda usando técnicas conocidas en la técnica. Se describen procedimientos adecuados para preparar una disolución de fibroína de seda en, por ejemplo, la solicitud de patente de EE.UU. con N° de serie 11/247.358; la solicitud de patente internacional WO/2005/012606; y el documento PCT/US07/83605. Por ejemplo, se puede lograr seda usada en un biopolímero de seda extrayendo sericina de los capullos de *B. mori*.

La gelificación sustancial se produce usualmente dentro de las veinticuatro horas posteriores al tratamiento de ultrasonificación. Por ejemplo, el gel de fibroína de seda se forma menos que cuatro horas después del tratamiento de ultrasonificación, tal como en dos horas después del tratamiento de ultrasonificación. En una realización particular, la fibroína de seda sufre gelificación en un periodo de tiempo que varía de aproximadamente cinco minutos a aproximadamente dos horas después del tratamiento de ultrasonificación. Por tanto, dependiendo de los requisitos, el tiempo de gelificación puede ser de minutos a horas, en base al tratamiento de ultrasonificación usado en la preparación de la disolución.

Los tratamientos de ultrasonificación son conocidos en la técnica. Para los fines de esta solicitud, los términos "ultrasonificación" y "sonicación" se están usando de manera intercambiable y tienen el mismo significado. Los tratamientos de ultrasonificación se pueden realizar de cualquier manera conocida en la técnica que aplica ultrasonificación a la fibroína de seda. El tratamiento de ultrasonificación puede implicar exponer la fibroína de seda a sonicación una vez, o puede implicar múltiples exposiciones independientes. La sonicación ha sido estudiada en el contexto de cambios estructurales de proteínas (Meinel et al., 71 J. Biomed. Mater. Res. A 25-34 (2004); Meinel et al., 88 Biotechnol. Bioeng. 379-91 (2004)), y se ha usado para generar grandes interfaces líquido-gas, efectos de calentamiento local, esfuerzos mecánicos/de cizallamiento, y reacciones de radicales libres. En contraste, en otros estudios relacionados con la gelificación de péptidos, las nanofibras de péptido ensambladas en el gel fueron rotas en fragmentos más pequeños por sonicación (Hung et al., 32 Ann. Biomed. Eng. 35-49 (2004)). En el contexto de las transiciones sol-gel de polímeros, la sonicación se ha usado típicamente para romper redes de gel y relicuar hidrogeles. La presente invención proporciona el nuevo uso de sonicación para inducir la transición sol-gel de la seda.

El tratamiento de ultrasonificación debe durar un periodo de tiempo suficiente para iniciar el proceso de gelificación, pero no tan largo como para comprometer las propiedades mecánicas del hidrogel. Por regla general, los tratamientos de ultrasonificación pueden durar de aproximadamente 5 segundos a aproximadamente 60 segundos, dependiendo de la cantidad de fibroína de seda usada, la concentración de la disolución, y otros factores apreciados por los expertos habituales en la técnica. Por ejemplo, los tratamientos de ultrasonificación duran de aproximadamente 15 segundos a aproximadamente 45 segundos. La gelificación empieza típicamente en el comienzo del tratamiento de ultrasonificación y continúa después que termina el tratamiento.

El tratamiento de ultrasonificación puede incluir otros tratamientos para ayudar en el proceso de gelificación. Por ejemplo, el tratamiento puede incluir una disolución salina. Se conocen en la técnica disoluciones salinas que ayudan a inducir la gelificación. Se pueden usar disoluciones salinas típicas que contienen iones de potasio, calcio, sodio, magnesio, cobre y/o cinc. El potasio puede ser ventajoso en una disolución salina en este contexto.

El tratamiento también puede incluir ajustar el pH de la disolución acuosa de fibroína. Como se sabe en la técnica, ajustar el pH de la disolución acuosa puede ayudar a inducir la gelificación. En particular, ajustar el pH más alto o bien más bajo puede ser eficaz. Por tanto, por ejemplo, se puede usar una disolución acuosa que tiene un pH de aproximadamente pH 4 o inferior, o aproximadamente pH 7,5 o superior.

En particular, usar una disolución salina de potasio a bajas concentraciones y a un pH bajo es a menudo eficaz. Una realización particular está dirigida hacia el uso de una sal de potasio donde la concentración salina es menos que 100 mM y el pH de la disolución es aproximadamente pH 4 o inferior.

La invención también proporciona un método para controlar el tiempo de gelificación de fibroína de seda poniendo en contacto una disolución de fibroína de seda con un tratamiento de ultrasonificación durante un periodo de tiempo suficiente para iniciar la gelificación bajo condiciones en que la gelificación se produce en aproximadamente dos horas. El procedimiento de sonicación da como resultado interacciones entre las cadenas de la fibroína de seda. Una realización particular proporciona un método para controlar el tiempo de gelificación de tal modo que la fibroína

de seda sufre gelificación en un periodo de tiempo que varía de aproximadamente cinco minutos a aproximadamente dos horas después del tratamiento de ultrasonificación.

Adicionalmente, se pueden usar diversos otros factores para controlar el tiempo de gelificación. Por ejemplo, el tiempo de gelificación puede ser controlado mediante la amplitud de la ultrasonificación y la concentración de la disolución de fibroína de seda. Por ejemplo, la amplitud varía de aproximadamente 25% a aproximadamente 35% de potencia de salida (típicamente, 7 vatios a 10 vatios), y la concentración de la fibroína de seda varía de aproximadamente 10% a aproximadamente 15% (p/v). En otra realización, la amplitud varía de aproximadamente 25% a aproximadamente 55% de potencia de salida (típicamente, 7 vatios a 21 vatios) y la concentración de la fibroína de seda varía de aproximadamente 5% a aproximadamente 10% (p/v). Los expertos habituales en la técnica, a la luz de la presente solicitud, pueden alterar la amplitud de la ultrasonificación y la concentración de la disolución de fibroína de seda para producir el nivel deseado de gelificación y el marco de tiempo deseado en el que se produce la gelificación.

El tiempo de gelificación también puede ser controlado añadiendo una disolución salina y ajustando la concentración de la disolución de fibroína de seda y la concentración de la disolución salina. La disolución salina puede incluir iones potasio, pero se pueden usar otras disoluciones salinas. En una realización específica, la concentración de la fibroína de seda es 4% (p/v) o inferior, y la concentración de la disolución salina de potasio varía de 20 mM a 100 mM.

Adicionalmente, el tiempo de gelificación puede ser controlado ajustando la concentración y el pH de la disolución salina, especialmente cuando la disolución salina contiene iones potasio. En una realización particular, la disolución salina es una disolución salina de potasio a un pH de aproximadamente pH 4 o inferior. Por ejemplo, la disolución salina de potasio tiene una concentración de 20 mM a 100 mM.

La invención también se refiere a un método para encapsular al menos un agente en fibroína de seda. El método comprende (a) exponer una disolución de fibroína de seda a un tratamiento de ultrasonificación durante un periodo de tiempo para iniciar la gelificación; y (b) introducir el agente en la fibroína de seda antes de que se produzca una gelificación sustancial en la fibroína de seda, formando así un agente encapsulado en fibroína de seda. El agente puede ser introducido en la disolución de fibroína de seda antes, durante o después del tratamiento de ultrasonificación.

El agente puede representar cualquier material capaz de ser encapsulado en el gel de fibroína de seda. Por ejemplo, el agente puede ser un agente terapéutico, tal como moléculas pequeñas y fármacos, o un material biológico, tal como células (incluyendo células madre), proteínas, péptidos, ácidos nucleicos (ADN, ARN, siARN), APN, aptámeros, anticuerpos, hormonas, factores de crecimiento, citocinas o enzimas. Encapsular un agente terapéutico o bien un material biológico es deseable porque el producto encapsulado puede ser usado para fines biomédicos.

Si se está encapsulando un agente terapéutico, el agente terapéutico puede ser introducido en la disolución de fibroína de seda antes, durante o después del tratamiento de ultrasonificación, ya que la mayoría de agentes terapéuticos no son afectados de manera adversa por la sonicación. Por otro lado, si se está encapsulando un material biológico, el material biológico puede ser afectado de manera adversa por la sonicación, y típicamente no debe ser introducido en la disolución de fibroína de seda hasta después del tratamiento de ultrasonificación. Esto puede no ser necesario para todos los materiales biológicos, pero se sabe que la sonicación daña o destruye células vivas, con lo que se debe tener precaución.

Cuando se introduce un agente después del tratamiento de ultrasonificación, las condiciones de tratamiento de ultrasonificación se pueden ajustar para que la gelificación se produzca algún periodo de tiempo después del tratamiento de ultrasonificación. Si la gelificación se produce durante el tratamiento de ultrasonificación o inmediatamente después, puede existir una insuficiente cantidad de tiempo para introducir el agente en la disolución de fibroína de seda. Por ejemplo, cuando el agente es introducido después del tratamiento de ultrasonificación, la fibroína de seda sufre gelificación en un periodo de tiempo que varía de aproximadamente cinco minutos a aproximadamente dos horas después del tratamiento de ultrasonificación.

Si se introduce un agente antes o durante el tratamiento de ultrasonificación, la gelificación se puede producir durante el tratamiento de ultrasonificación, inmediatamente después, o un periodo de tiempo después del tratamiento de ultrasonificación. Por lo tanto, cuando el agente se introduce antes o durante el tratamiento de ultrasonificación, la fibroína de seda puede sufrir gelificación en aproximadamente dos horas después del tratamiento de ultrasonificación.

Cuando se introducen agentes terapéuticos o material biológico en la fibroína de seda, también se pueden añadir con el agente otros materiales conocidos en la técnica. Por ejemplo, puede ser deseable añadir materiales para promover el crecimiento del agente (para materiales biológicos), promover la funcionalidad del agente después de que es liberado de la encapsulación, o aumentar la capacidad del agente para sobrevivir o retener su eficacia durante el periodo de encapsulación. Los materiales conocidos por promover el crecimiento celular incluyen medios de crecimiento celular, tales como Medio Eagle modificado de Dulbecco (DMEM), suero bovino fetal (FBS), aminoácidos no esenciales y antibióticos, y factores de crecimiento y morfogénicos tales como factor de crecimiento de fibroblastos (FGF), factores de crecimiento transformadores (TGFs), factor de crecimiento endotelial vascular

(VEGF), factor de crecimiento epidérmico (EGF), factor de crecimiento similar a la insulina (IGF-I), factores de crecimiento morfogénico de huesos (BMPs), factores de crecimientos de nervios, y proteínas relacionadas. Opcionales adicionales para la entrega por medio de los geles incluyen ADN, siARN, antisentido, plásmidos, liposomas y sistemas relacionados para la entrega de materiales genéticos; péptidos y proteínas para activar cascadas de señalización celular; péptidos y proteínas para promover mineralización o eventos relacionados desde células; péptidos y proteínas de adhesión para mejorar interfaces gel-tejido; péptidos antimicrobianos; y proteínas y compuestos relacionados.

Los agentes terapéuticos o materiales biológicos encapsulados en fibroína de seda son adecuados para un dispositivo de bioentrega. Se pueden encontrar técnicas para usar fibroína de seda como dispositivo de bioentrega, por ejemplo, en la solicitud de patente de EE.UU. con N° de serie 10/541.182; N° 11/628.930; N° 11/664.234; N° 11/407.373; documentos PCT/US207/020789; PCT/US08/55072.

La estructura del hidrogel de fibroína de seda permite que el vehículo de bioentrega tenga una liberación controlada. La liberación controlada permite entregar dosificaciones a lo largo del tiempo, con una cinética de liberación controlada. En algunos casos, la entrega del agente terapéutico o material biológico es continua hacia el sitio donde se necesita el tratamiento, por ejemplo, a lo largo de varias semanas. La liberación controlada a lo largo del tiempo, por ejemplo, a lo largo de varios días o semanas, o más tiempo, permite la entrega continua del agente terapéutico o material biológico para obtener tratamientos preferidos. El vehículo de entrega controlada es ventajoso porque protege al agente terapéutico o material biológico de la degradación *in vivo* en fluidos corporales y tejidos, por ejemplo, por proteasas.

Considerando además la estrategia de inducir la formación de gel de seda usando sonicación, muestras de 0,5 ml de disoluciones acuosas de fibroína de seda a concentraciones de 1%, 2%, 6% y 20% (p/v) se sonicaron como se describe a continuación. Cuando la potencia de salida fue mantenida constante (20% de amplitud), el tiempo de gelificación de la fibroína de seda disminuyó al aumentar el tiempo de sonicación (Fig. 1). Para cada aumento en la concentración de seda de 1% a 6% (p/v), el tiempo de gelificación disminuyó significativamente ($p < 0,01$ entre muestras * en la Fig. 1). La muestra al 20% (p/v) tuvo un tiempo de gelificación similar o incluso más largo que la muestra al 6% (p/v) (Fig. 1). Este resultado para la muestra al 20% es probablemente debido a la alta viscosidad de la disolución, por lo que las ondas de sonicación no pudieron propagarse eficazmente en la disolución. Cuando se usó la potencia de salida por encima de 30% de amplitud, la sonicación generó espumas espesas y la fibroína de seda no se gelificó de una manera homogénea.

Esta espumación no se observó cuando se incrementó el volumen para la sonicación a 5 ml, incluso a niveles de potencia tan altos como 55% de amplitud. Cuando se sonicaron concentraciones más altas a volúmenes que excedían de 5 ml, sin embargo, se produjo una gelificación heterogénea. Se usaron pequeños volúmenes de disolución de seda (sin tratamiento en autoclave) para la optimización de la sonicación y las caracterizaciones del gel (pH, efecto salino y medida del DC), y se usaron disoluciones de seda tratadas en autoclave para estudios mecánicos, de degradación, y de encapsulación de células. De manera interesante, cuando se compararon con las disoluciones originales, el tratamiento en autoclave no cambió significativamente los parámetros de sonicación usados y los tiempos de gelificación relacionados, sugiriendo que la proteína fibroína de seda retuvo importantes rasgos de su estructura original en estado de disolución y la capacidad de transición estructural al estado de láminas β en la formación de un gel después del autoclave. Se pueden investigar adicionalmente alteraciones estructurales debidas a tratamientos en autoclave, pero este aspecto proporciona facilidad en la preparación en escala comercial de productos farmacéuticos.

Durante la gelificación de fibroína de seda, la transición sol-gel fue relacionada con un aumento en la formación de láminas β por cambios observados en medidas de diroísmo circular (DC) (Fig. 2A). Después de la sonicación, se observó una rápida formación de la estructura de láminas β , seguido de una transición más lenta, en base al aumento de elipticidad a 217 nm (Fig. 2B). La gelificación de la fibroína de seda se produjo en este punto de la transición, donde la formación rápida inicial de la estructura de láminas β se ralentizó. Esta transición es consistente con estudios emprendidos previamente (Matsumoto et al., 2006), sugiriendo que pueden estar implicados mecanismos similares. La formación de la estructura de láminas β resulta de una interacción hidrófoba alterada y las subsiguientes reticulaciones físicas. Esta etapa inicial es seguida por una organización más lenta de las cadenas y la formación de una red de gel dentro de un marco de tiempo relativamente largo comparado con los cambios iniciales inducidos por la sonicación. Este mecanismo de gelificación de seda en dos etapas se representa de manera esquemática en la Fig. 2C.

Los parámetros estudiados para influir en las velocidades de gelificación pueden ser vistos como un método para recapitular el proceso de hilado natural del gusano de seda. Los parámetros de procesamiento clave incluyen los efectos de la sonicación, como un imitador de las fuerzas de cizallamiento aumentadas experimentadas en la división anterior de la glándula del gusano de seda, el tipo y concentraciones del catión, y el pH.

Es aceptado que, en la sonicación, la vibración mecánica causa la formación y rotura de burbujas. Como resultado de esta cavitación, los medios pueden experimentar efectos locales extremos: calentamiento (9.727°C (10.000 K)), alta presión (20MPa (200 bar)) y altas velocidades de deformación (10^7 s^{-1}) (Paulusse & Sijbesma, 44 J. Polym. Sci.-Polym. Chem. 5445-53 (2006); Kemmere et al., 290 Macromol. Mater. Eng. 302-10 (2005). Estos fenómenos físicos

han sido explotados en diversas aplicaciones, que incluyen autoensamblaje y gelificación de un copolímero de N-isopropilacrilamida/ácido acrílico (Seida et al., 90 J. Appl. Polym. Sci. 2449-52 (2003)), fluidos orgánicos con péptidos metalados (Isozaki 119 Angew Chem. 2913-15 (2007)), y péptidos autoensamblantes sintéticos (Yokoi et al., 102 Proc Nat Acad Sci USA 8414-19 (2005)). Aparte de péptidos, proteínas tales como albúmina de suero humano y mioglobina se han estudiado con sonicación como una estrategia para caracterizar la agregación y autoensamblaje relacionados con estados de enfermedad (Stathopoulos et al., 13 Protein Sci. 3017-27 (2004); Mason & Peters, PRACTICAL SONOCHEM: USES & APPL. ULTRASOUND (2ª ed., Chichester, West Sussex, UK (2002))).

Dada la amplitud del comportamiento de los sistemas poliméricos en respuesta a la sonicación, es probable que varios factores físicos relacionados con la sonicación, incluyendo aumentos locales de temperatura, fuerzas mecánicas/de cizallamiento, e interfaces aire-líquido aumentadas afecten al proceso de gelificación rápida de fibroína de seda. En particular, los cambios inducidos por sonicación en la hidratación hidrófoba darían como resultado la formación acelerada de reticulaciones físicas, tales como interacciones de cadena iniciales relacionadas con la formación de láminas β . En el presente estudio, durante el procedimiento de sonicación, la temperatura de la disolución aumentó de la temperatura ambiente a 40°C-71°C durante un corto periodo de tiempo (5 min-6 min), que refleja un pico transitorio en la temperatura local. En un estudio pasado, la gelificación requirió unos días cuando se mantuvieron muestras masivas a 60°C, sin sonicación (Kim et al., 2004). Por lo tanto, los efectos de la temperatura local contribuyen probablemente a la cinética aumentada de la gelificación, pero no son los únicos responsables de las respuestas de corta duración encontradas. La dinámica de cadena localizada y los cambios en los estados de hidratación de las cadenas hidrófobas, influenciadas por el aumento transitorio de la temperatura, son probablemente responsables de la formación de las reticulaciones físicas hidrófobas.

Los rasgos únicos de las secuencias de bloques hidrófobos en las cadenas de fibroína de seda son particularmente adecuados para este tipo de técnica, debido al crítico papel del agua en el control de las interacciones intra- e inter-cadena (Jin et al., 2003). Podría ser útil extender la técnica a otros sistemas biopoliméricos para determinar el impacto de la química de cadenas en procedimientos de sonicación controlados de ensamblaje de cadenas. Se ha reportado la degradación de colágeno relacionada con sonicación, como método para fragmentar cadenas para facilitar estudios de reensamblaje (Giraud-Guille & Besseau, 113 J. Struct. Biol. 99-106 (1994)). Se debe apuntar que la presente estrategia no dio como resultado una degradación significativa de cadenas, debido a la corta duración del procedimiento de sonicación usado, en base a análisis SDS-PAGE.

Se suplementaron disoluciones acuosas de fibroína de seda con K^+ y Ca^{2+} a diversas concentraciones fisiológicamente relevantes antes de la sonicación. Como se muestra en la Fig. 3A, a concentración de K^+ baja (20 mM-50 mM) el tiempo de gelificación disminuyó considerablemente al aumentar la concentración de K^+ ($p < 0,05$ entre muestras *). A concentración de K^+ alta (100 mM-200 mM), sin embargo, la gelificación fue inhibida (Fig. 3A). Estos resultados se observaron para concentraciones de fibroína de seda que variaban de 0,5% a 8% (p/v). Por encima de 8%, no se observó efecto salino, ya que se producía gelificación rápidamente en todas las muestras (< 2 min). En comparación con el K^+ , el Ca^{2+} a las mismas concentraciones indujo una gelificación de la fibroína de seda más lenta (compárense las Fig. 3A y 3B). Cuando la concentración de Ca^{2+} fue aumentada de 20 mM a 200 mM, el tiempo de gelificación de la fibroína de seda aumentó significativamente ($p < 0,05$ entre muestras * en la Fig. 3B). En contraste, en un trabajo previo, el Ca^{2+} promovió la gelificación de la fibroína de seda, mientras que el K^+ no tuvo efecto (Kim et al., 2004), un resultado diferente de las observaciones en la presente estrategia.

El pH de la disolución acuosa de fibroína de seda se ajustó antes de la sonicación, a fin de determinar los efectos sobre la gelificación. Disminuir o bien aumentar el pH promovió la gelificación ($p < 0,05$ entre muestras * en la Fig. 3C). El efecto del pH más bajo (pH<4) fue más pronunciado que el del pH más alto (pH>9) en inducir gelificación ($p < 0,05$ entre muestras $\diamond$ en la Fig. 3C), consistente con estudios previos (Kim et al., 2004; Matsumoto et al., 2006).

Las curvas de esfuerzo/deformación que resultan de ensayos mecánicos sobre los geles mostraron una linealidad que precede a una región meseta, sugiriendo que los geles tienen una gran (~5%-10% de deformación) y probable característica viscoelástica, después de la cual se induce un daño permanente por formación de grietas. Los geles fabricados en este estudio rindieron de manera similar a geles estudiados en un trabajo previo (Kim et al., 2004), en que las correspondientes concentraciones de fibroína de seda dieron valores similares tanto para el límite elástico (Fig. 4A) como el módulo elástico "tradicional" (Fig. 4B). Ambas medidas parecieron estar correlacionadas positivamente con la concentración del gel de seda. Mediante inspección, las diferencias en la concentración (p/v) de fibroína de seda fueron determinantes más significativos de las propiedades mecánicas finales del hidrogel, en lugar de la variación debida a las condiciones de sonicación (Fig. 4A y 4B). Asimismo, los valores del módulo de equilibrio parecieron estar correlacionados positivamente con la concentración del gel de seda (Fig. 4C).

Cuando se comparan con otros hidrogeles encapsulantes de células degradables, tales como alginato, agarosa, geles reticulados de polietilenglicol, fibrinógeno y otros sistemas (Almany & Seliktar 26(15) Biomats. 4023-29 (2005); Kong et al., 24(22) Biomats. 4023-29 (2003); Hung et al., 2004; Bryant et al., 86(7) Biotechnol Bioeng 747-55 (2004); Kang et al. 77(2) J. Biomed. Mater. Res. A 331-39 (2006); Rowley et al., 20(1) Biomats. 45-53 (1999); Broderick et al., 72 J. Biomed. Mater. Res. B-Appl Biomater. 37-42 (2004); Zhang et al., 15 J. Mater. Sci. Mater. Med. 865-75 (2004)), los hidrogeles de seda de rápida formación, alta concentración, exhibieron propiedades mecánicas superiores (Tabla 1). Los datos fueron recogidos en base a similitudes entre encapsulación de células y protocolos de ensayo mecánicos, en los que se determinaron valores de módulo "tradicional" o bien de equilibrio.

Tabla 1. Propiedades mecánicas comparativas entre sistemas de gel de polímeros degradables usados para encapsulación de células

Material	Módulo tradicional (kPa)	Bibliografía
Hidrogeles de seda	369-1.712	Wang et al., 29 Biotmats. 1054-64 (2007)
Fibrinógeno y copolímero fibrinógeno-PEG ^a	0,02-4	Almany & Seliktar, 2005
Poli(citrato de 1,8-octanodiol) (POC)	10,4	Kang et al., 2006
copolímero de dimetacrilato de PEG-PLA (fotorreticulado)	60-500	Bryant et al., 2004
Gelatina	0,18	Rowley et al., 1999
gelatina, reticulada con glutaraldehído	8,13	Rowley et al., 1999
Dex-AI/PNIPAAm	5,4-27,7	Zhang et al., 2004
Alginato (reticulado con calcio) ^d	~25-125	Smith & Mooney, 2003
Material	Módulo de equilibrio (kPa)	Bibliografía
Hidrogeles de seda	63-441	Wang et al., 29 Biotmats. 1054-64 (2007)
Agarosa (concentración final 2%)	~15	Hung et al., 2004

^a5 mm de diám. x 5 mm de altura. Velocidad de deformación de 1,5 mm/min, módulo basado en la pendiente media de la porción más baja de la curva esfuerzo-deformación (<15%).

5 ^b6 mm de diám. x 2,4 mm de altura. Velocidad de deformación de 2 mm/min, módulo basado en la pendiente media de la porción inicial de la curva esfuerzo-deformación.

^c5 mm de diám. x 1 mm de altura. Velocidad de deformación controlada por carga de 40-100 mN/min.

10 ^d12,5 mm de diám. x 1,5 mm de altura. Velocidad de deformación controlada por carga de 25 mN/min, módulo de Young equivalente al valor absoluto de la pendiente obtenida entre la fuerza de precarga inicial 0,01 N a 0,25 N.

^e6 mm de diám. Velocidad de deformación de 0,5 mm/min, módulo basado en la pendiente media de la porción más baja de la curva esfuerzo-deformación.

15 ^f12,7 mm de diám x 2 mm de altura. Velocidad de deformación de 1 mm/min. Los módulos elásticos se obtuvieron a partir de la pendiente de las curvas de esfuerzo frente a deformación, limitado al primer 10% de deformación.

^gMódulo de equilibrio calculado a partir del esfuerzo de equilibrio y área de sección transversal inicial a 10% de deformación.

20 La degradación enzimática (proteasa XIV) de películas de fibroína de seda, andamios sólidos porosos e hilos de fibroína de seda ha sido estudiada previamente (Horan et al., 2005; Kim et al., 2005; Jin et al., 2005). Usando la misma concentración de proteasa (5 U/ml), todos los hidrogeles de fibroína de seda mostraron una rápida degradación, con aproximadamente 80% de pérdida de masa en los primeros cuatro días, con una velocidad de degradación mucho más lenta después (Fig. 5). La degradación de los hidrogeles fue dependiente de la concentración de fibroína de seda. Cuando se aumentó la concentración de 4% a 12% (p/v), el tiempo de degradación para alcanzar el 50% de pérdida de masa aumentó de 1,5 días a 3 días (Fig. 5). Las muestras de control, hidrogeles de fibroína de seda incubados en PBS en lugar de proteasa, fueron estables a lo largo del periodo de incubación (Fig. 5). La degradación rápida (en días) de hidrogeles de seda debido a procesos proteolíticos puede ser adecuada para algunas aplicaciones, tal como en escenarios de curación de heridas o entrega rápida de fármacos. Se debe apuntar, sin embargo, que los tiempos de degradación proteolítica discutidos en la presente memoria son *in vitro*; en contraste los tiempos de vida *in vivo* son generalmente más largos, y los marcos de tiempo serán específicos a los tejidos.

Se han encapsulado con éxito hMSCs en diversos sistemas de hidrogeles, tales como polietilenglicol, agarosa, colágeno y alginato, debido al potencial de estas células para la reparación o regeneración de tejidos y liberación de fármacos a largo plazo (véase Nuttelman et al., 24 Matrix Biol. 208-18 (2005); Nuttelman et al., 27 Biomats. 1377-86

(2006); Mauck et al., 14 Osteoarthr. Cartilage 179-89 (2006); Lewus & Nauman, 11 Tissue Eng. 1015-22 (2005); Majumdar et al., 185 J. Cell Physiol. 98-106 (2000); Boison, 27 Trends Pharmacol. Sci. 652-58 (2006)). Los hidrogeles de seda con menos que 4% (p/v) de proteína fueron difíciles de manipular debido a limitaciones físicas. Por lo tanto, para encapsulación de hMSC se usaron hidrogeles de 4%, 8% y 12% (p/v) de fibroína de seda. En las tres concentraciones de gel, las células retuvieron su forma redonda original y distribución homogénea en el día uno. En el día seis, aparecieron defectos en algunas células en el gel al 12%, y la morfología celular había cambiado. En el día veintiuno, las células en el gel al 4% estaban sin cambios cuando se compararon con el día uno, mientras que las células en los geles al 8% y 12% estaban deformadas y agregadas en gran medida. El análisis histológico reveló que las hMSCs dentro de la matriz del gel al 4% retuvieron la forma redonda y no estuvieron agregadas en todo el estudio, mientras que las cercanas a la superficie de los geles crecieron fuera del gel y cambiaron la morfología de la forma redonda a formas similares a husos desde el día seis. Todas las hMSCs, bien similares a husos cercanas a la superficie del gel o bien de forma redonda encapsuladas en el gel, estaban vivas, como se ve por fluorescencia verde en el ensayo de vida-muerte. Por lo tanto, las hMSCs mantuvieron su actividad y función en el sistema de hidrogel de seda al 4% durante al menos veintiún días. Las hMSCs en los geles al 8% y 12%, sin embargo, cambiaron en gran medida su morfología y muchas de ellas murieron, se agregaron y/o disolvieron, como se ve por las cavidades vacías en imágenes histológicas y pocos puntos verdes fluorescentes en el ensayo de vida-muerte. El gel de seda de control, sin células encapsuladas, mostró un fondo de fuerte fluorescencia roja, que enmascaraba la fluorescencia roja de células muertas en el ensayo de vida-muerte.

Estas observaciones y conclusiones fueron apoyadas además por cuantificación de ADN (ensayo PicoGreen) (Fig. 6). Las células proliferaron significativamente en los tres hidrogeles a lo largo de los primeros 6 días ($p < 0,05$ entre las muestras * en la Fig. 6). Para el gel al 4%, el número de células dejó de aumentar después de seis días, indicando que se alcanzó la capacidad máxima del gel para la proliferación celular. Se observó un fenómeno similar en otros sistemas de hidrogel tales como PEG y alginato (Nuttelman et al., 2006; Ramdi et al., 207 Exp. Cells Res. 449-54 (1993)). Para los geles al 8% y 12%, el número de células disminuyó después de seis días, consistente con las observaciones microscópicas, histológicas y de vida-muerte. La pérdida de actividad en los geles de concentración más alta es probablemente debida a limitaciones de transporte de masa, pero también puede ser debida a restricciones mecánicas impuestas a estas concentraciones de gel más altas. La posibilidad de que los geles de seda fueran tóxicos para las hMSCs puede ser excluida, porque las hMSCs que crecieron en la parte superior de los geles de seda al 4%, 8% y 12% tuvieron velocidades de crecimiento similares a las que crecieron en la placa de cultivo celular de control, y las morfologías celulares (forma de huso) fueron similares entre todos los grupos. La optimización de las condiciones para estabilizar concentraciones de gel más bajas (1% y 2%) pueden ser exploradas siguiendo las enseñanzas proporcionadas en la presente memoria, y las velocidades de difusión de oxígeno y nutrientes a través de diversas concentraciones de geles de seda pueden ser estudiadas en detalle.

Se proporciona en la presente memoria un nuevo método, basado en ultrasonificación, que permite la formación rápida de hidrogeles de fibroína de seda. La gelificación pudo ser inducida en minutos a horas, dependiendo de la potencia de salida y la duración de la sonicación. La gelificación fue acompañada de formación de estructuras de láminas β , debido a cambios en la hidratación hidrófoba. Las concentraciones bajas de K^+ y el pH bajo aceleraron las velocidades de gelificación, mientras que la presencia de Ca^{2+} y concentraciones altas de K^+ impidieron la gelificación. Los hidrogeles de fibroína de seda tuvieron propiedades mecánicas superiores a las reportadas previamente, en el intervalo 369-1712 kPa en base a módulo compresivo. La resistencia mecánica del gel aumentó al aumentar la concentración de la disolución de fibroína de seda. Los hidrogeles de fibroína de seda al 4% (p/v) fueron adecuados para encapsulación de hMSCs; las células retuvieron la viabilidad y proliferación en condiciones de cultivo estáticas a lo largo de semanas.

La invención será caracterizada adicionalmente mediante los siguientes ejemplos, que pretenden ser ilustrativos de las realizaciones.

Ejemplos

Ejemplo 1. Disoluciones de fibroína de seda

Se prepararon disoluciones acuosas madre de fibroína de seda como se ha descrito previamente (Sofia et al., 54 J. Biomed. Mater. Res. 139-48 (2001)). Brevemente, se hirvieron capullos de *B. mori* durante 40 min en una disolución acuosa de carbonato de sodio 0,02 M, y después se enjuagaron profusamente con agua pura. Después de secar, la fibroína de seda extraída se disolvió en una disolución de LiBr 9,3 M a 60°C durante 4 horas, dando una disolución al 20% (p/v). Esta disolución fue dializada contra agua destilada usando cartuchos de diálisis Slide-a-Lyzer (MWCO 3.500, Pierce, Rockford, IL) durante dos días para retirar la sal. La disolución fue ópticamente transparente después de la diálisis, y se centrifugó para retirar las pequeñas cantidades de agregados de seda que se formaron durante el proceso, usualmente por contaminantes ambientales que están presentes en los capullos. La concentración final de la disolución acuosa de fibroína de seda fue aproximadamente 8% (p/v). Esta concentración se determinó pesando el sólido residual de un volumen conocido de disolución después de secar. Se prepararon disoluciones de seda con concentraciones más bajas diluyendo la disolución de 8% con agua. Para obtener una disolución de seda con concentración más alta, se dializó la disolución de 8% en un cartucho de diálisis Slide-a-Lyzer (MWCO 3.500, Pierce) contra una disolución de PEG al 10% (p/v) (10.000 g/mol) durante al menos 24 horas a temperatura ambiente (Jin & Kaplan, 2003; Kim et al., 2004). El volumen se ajustó con agua hasta alcanzar la concentración

deseada. Todas las disoluciones se almacenaron a 4°C antes del uso.

Ejemplo 2. Disoluciones de seda con diversas concentraciones salinas y pH

Para determinar el efecto de la concentración salina sobre la gelificación de la seda, se añadieron disoluciones madre de KCl y CaCl₂ a 1 M a disoluciones de seda hasta alcanzar una concentración salina final de 20 mM a 200 mM. Para determinar el efecto del pH sobre la gelificación, se valoraron disoluciones de seda con disoluciones de HCl o NaOH 1 M y el pH se monitorizó usando un medidor de pH.

Ejemplo 3. Cribado para condiciones de gelificación de seda

Para determinar la gelificación de seda bajo diversas condiciones de sonicación, se sonicaron 0,5 ml de disolución de seda (acuosa) en un tubo Eppendorf de 1,5 ml con un ultrasonicador Branson 450 (Branson Ultrasonics Co., Danbury, CT), que consistía en el Modelo de Fuente de Alimentación 450, Convertidor (Pieza Nº 101-135-022), Cuerno Interruptor Roscado Externamente de 1,27 cm (1/2 pulgada) (Pieza Nº 101-147-037), y Micropunta Afilada de 0,32 cm (1/8 de pulgada) de diámetro (Pieza Nº 101-148-062). La potencia de salida fue variada de 10% a 50% de amplitud (3 vatios-21 vatios) y el tiempo de sonicación fue variado de 5 s-30 s. Para determinar los efectos de las sales y el pH sobre la gelificación, 0,5 ml de las disoluciones de seda preparadas como se describe anteriormente se sonicaron a 20% de amplitud (7 vatios) y 15 s. Las disoluciones se incubaron a 37°C después de la sonicación, y la transición sol-gel fue monitorizada visualmente dando la vuelta al tubo y comprobando el cambio de opacidad de la disolución (Matsumoto et al.).

En base a los resultados preliminares, se usaron concentraciones de fibroína de seda hasta 12% (p/v) para mantener una viscosidad más baja, y la disolución al 12% se gelificó más rápido que las muestras al 8% y 4%. Estos resultados se exponen en la Tabla 2, a continuación.

Tabla 2. Tiempo de gelificación para un volumen grande (5 ml-7 ml) de disolución acuosa de fibroína de seda después de la sonicación.

	7 W, 30 s	10 W, 30 s	15 W, 30 s	21 W, 30 s
4% (p/v)	Sin gel en 1 semana	Sin gel en 1 semana	5 días	12 h (1 h-2 h después de la 2ª sonicación)
8% (p/v)	6 días	22-24 h	45-60 min	15-30 min
12% (p/v)	4 días	1,5-2 h	15-30 min	gel en tubo

Nota: el tiempo de gelificación se estimó y promedió en base al menos a dos experimentos independientes.

Ejemplo 4. Dicroísmo circular (DC)

Una alícuota de 0,5 ml de disolución (acuosa) de seda al 2% se sonicó a 20% de amplitud (7 vatios) durante 30 s, e inmediatamente se cargó en una celda de cuarzo sándwich, de 0,01 mm de camino óptico (Nova Biotech, El Cajon, CA). La medida del DC se realizó con un espectrofotómetro Jasco-720 CD (Jasco Co., Japón). Todas las muestras fueron barridas a 37°C con un tiempo de acumulación de 4 s a la velocidad de 100 nm/min, y los resultados fueron promediados a partir de cuatro experimentos repetidos. Para la medida cinética de la formación de la estructura de láminas β, se monitorizó el cambio de elipticidad a 217 nm durante 2,5 horas con muestreo cada 10 s.

Ejemplo 5. Ensayo mecánico

Se preparó un volumen grande de gel de seda por sonicación a fin de tener capacidad para el ensayo mecánico. Disoluciones de seda, 4%, 8% y 12% (p/v) en matraces de vidrio, se trataron en autoclave 20 min a 121°C. La disolución tratada en autoclave fue suplementada con polvo de Medio Eagle Modificado de Dulbecco (polvo DMEM, Invitrogen, Carlsbad, CA) y bicarbonato de sodio (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) hasta una concentración de 0,135 g/ml y 0,037 g/ml, respectivamente. El pH resultante de la disolución fue pH 7,4, que se verificó con un medidor de pH. Se añadió una alícuota de 7 ml a un tubo de plástico Falcon de 15 ml y después se sonicó a 20%, 30%, 40% de amplitud (7 vatios, 10 vatios, 15 vatios, respectivamente) durante 30 s. Se añadieron seis ml de la disolución sonicada a placas de cultivo pequeñas (BD Falcon™, Nº 35-3001, BD Biosciences, Palo Alto, CA) que fueron monitorizadas visualmente en una incubadora a 37°C, a fin de aproximar parámetros de cultivo celular, hasta que la gelificación fue completa en base a rasgos opacos y condensación sobre la superficie del gel. Posteriormente, se extrajeron por punción trozos de 9,525 mm de diámetro (2 mm-3 mm de altura) para ensayos mecánicos inmediatamente después de la gelificación. Los trozos de gel fueron preacondicionados en disolución DMEM completa (Gibco/Invitrogen) durante >1 hora antes del ensayo.

Todas las muestras fueron sumergidas en DMEM para almacenamiento y ensayadas en 24 horas. Las muestras fueron evaluadas en una máquina 3366 Instron (Norwood, MA) equipada con platinas de compresión no confinada y un transductor de carga 100N. Se empleó el método de extensión compresiva, con una velocidad de extensión de 1 mm/min. Se determinaron el esfuerzo y la deformación compresivos, y el módulo elástico se calculó en base a una

técnica semiautomática. El diagrama de esfuerzo-deformación fue segmentado en ocho secciones por debajo de un nivel de esfuerzo límite establecido más allá de la parte lineal inicial del diagrama. Usando ajuste de mínimos cuadrados, la pendiente más alta entre estas ocho secciones se definió como el módulo compresivo para la muestra. La resistencia compresiva se determinó usando una estrategia de inclinación-cesión. Se dibujó una línea paralela a la línea del módulo, pero inclinada en 0,5% de la longitud de calibre de la muestra. El correspondiente valor de esfuerzo en el que la línea de inclinación cruzó la curva de esfuerzo-deformación se definió como la resistencia compresiva del andamio. Este ensayo se realizó según una modificación basada en el método ASTM F451-95.

Se siguieron dos regímenes de ensayo de compresión no confinada para evaluar la influencia de las condiciones de sonicación sobre el rendimiento mecánico. Primero, se usó un ensayo de deformación a fallo para extraer una propiedad de rigidez del material tradicional y observar una respuesta de fallo (Almany & Seliktar 26(15) Biomats. 2467-77 (2005); Kong et al., 24(22) Biomats. 4023-29 (2003)). Segundo, se usó un ensayo de relajación del esfuerzo para evaluar las propiedades del módulo de equilibrio, en base a parámetros de ensayo de Hung et al. (32 Ann. Biomed. Eng. 35-49 (2004)). Juntas, estas medidas proporcionan comparaciones más amplias frente a las propiedades publicadas de otros hidrogeles degradables usados para encapsulación celular. Se evaluaron N = 4 muestras para cada grupo reportado, y se ensayaron en una máquina 3366 Instron (Norwood, MA) equipada con platinas de compresión no confinada y un transductor de carga 100N, y los datos de las muestras se exportaron usando el programa informático Bluehill, versión 2.0.

Para el ensayo deformación a fallo, cada muestra se comprimió a una velocidad controlada en extensión de 1 mm/min, empezando después de que se alcanzaron cargas de tara nominales, y se registraron las alturas de las muestras. El esfuerzo y deformación compresivos se determinaron normalizando frente a geometrías de muestra, y el módulo elástico "tradicional" se calculó como la pendiente de una línea tangencial establecida en la parte de 5% de deformación de cada curva esfuerzo/deformación. El límite elástico se determinó inclinando una línea paralela a la línea tangencial en 2% de deformación; donde la línea de inclinación intersectó la respuesta esfuerzo/deformación se definió como el límite elástico (que coincidió con el comienzo del fallo). Para el ensayo de relajación del esfuerzo, las muestras fueron sumergidas en suero salino tamponado con fosfato (PBS) y se dejaron bajo una carga de tara nominal durante 200 s. Después de eso, las muestras fueron comprimidas a 1 mm/min hasta que se alcanzó 10% de deformación, que fue mantenida durante 20 min. El módulo de equilibrio se calculó normalizando el esfuerzo de relajación en 10% de deformación.

Ejemplo 6. Degradación enzimática *in vitro* de geles de seda

Se prepararon trozos de gel de seda (diámetro = 4 mm; altura = 2 mm-3 mm) a 4%, 8%, 12% (p/v) como se describió anteriormente, y se sumergieron después en 1 ml de disolución de Proteasa XIV (Sigma-Aldrich) en una placa de 24 pocillos. La disolución de proteasa se preparó en fresco disolviendo el polvo de la enzima en PBS hasta alcanzar una concentración de 5 U/ml, y se reemplazó con disolución preparada en fresco cada 24 h. Los trozos de control se sumergieron en 1 ml de PBS que también fue renovado cada 24 h. Todas las muestras fueron incubadas a 37°C. En los días 1, 2, 3, 4 y 7, se lavaron cuatro trozos con agua, se frotaron con un pañuelo de papel para retirar el exceso de agua sobre la superficie del gel, y se pesaron.

Ejemplo 7. Siembra y cultivo de hMSCs en geles de seda

Se aislaron hMSCs de aspirados frescos de médula ósea entera de donantes que habían dado su consentimiento (Clonetic-Poietics, Walkersville, MD) como se ha descrito previamente (Meinel et al., 71 J. Biomed. Mater. Res. A 25-34 (2004); Meinel et al., 88 Biotechnol. Bioeng. 379-91 (2004)), y el cultivo se expandió en un medio de crecimiento que contenía 90% de DMEM, 10% de suero bovino fetal (FBS), aminoácidos no esenciales 0,1 mM, penicilina 100 U/ml, estreptomycin 1000 U/ml, 0,2% del antimicótico fungizona, y 1 ng/ml de factor de crecimiento de fibroblastos básico (bFGF). Antes del uso, células de 3-4 pases fueron tripsinizadas desde matraces de cultivo y resuspendidas en DMEM para obtener una densidad celular de 5×10^7 células/ml. Se esterilizaron con vapor (en autoclave) quince ml de disolución de seda a 4%, 8% y 12% (p/v) y se suplementaron con polvo de DMEM y bicarbonato de sodio como se describió anteriormente. Se añadió una alícuota de 5 ml a un tubo de plástico falcon de 15 ml y se prepararon un total de dos tubos (control y célula sembrada) para cada concentración de seda. Se sonicó una disolución de seda al 4% (p/v) (5 ml) en una campana de flujo laminar a 50% de amplitud durante 30 s, y después de 30 min de incubación la disolución se sonicó de nuevo bajo las mismas condiciones. Después de la segunda sonicación, la disolución se enfrió hasta la temperatura ambiente en 5 min-10 min, y después se añadieron 50 ml de la suspensión celular y se mezclaron con la disolución de seda sonicada hasta alcanzar una concentración final de 5×10^5 células/ml. La muestra de control se sonicó de la misma manera, pero se añadieron 50 ml de DMEM en lugar de la suspensión celular después de la sonicación. Se pipeteó rápidamente una alícuota de 1,5 ml de las mezclas en placas de cultivo celular de 12 pocillos, con un total de tres pocillos preparados para cada grupo de muestras. Las disoluciones al 8% y 12% (p/v) se sonicaron una vez a 40% y 30% de amplitud, respectivamente, durante 30 s. Se añadió una alícuota de 50 ml de suspensión de hMSC y la mezcla se llevó a placa como se describió anteriormente. Después, todas las placas se incubaron a 37°C y 5% de CO₂.

Una vez que la seda se gelificó en las placas en 0,5 h-2 h, se extrajeron por punción pequeños trozos (diámetro = 4 mm; altura 2-3 mm) de los geles y se pusieron en los pocillos de una nueva placa de 24 pocillos. Después, los trozos fueron cultivados en 1 ml de medio de crecimiento que contenía 90% de DMEM, 10% de FBS, aminoácidos no

esenciales 0,1 mM, penicilina 100 U/ml, estreptomicina 1000 U/ml, 0,2% del antimicótico fungizona, a 37°C y 5% de CO₂. Para la obtención de imágenes de microscopía, los geles de seda con hMSC encapsuladas con un volumen de 0,5 ml se prepararon en placas de 24 pocillos y se cultivaron en 1 ml del mismo medio de crecimiento y bajo las mismas condiciones que anteriormente, y se tomaron imágenes en puntos de tiempo deseados.

5 Ejemplo 8. Análisis de hMSCs encapsuladas en geles de seda

Microscopía de contraste de fases - En los días 2, 6, 14 y 21 de cultivo, la morfología celular fue monitorizada mediante un microscopio de luz de contraste de fases (Carl Zeiss, Jena, Alemania) equipado con una cámara de vídeo en color Sony Exwave HAD 3CCD.

10 Proliferación celular - La proliferación celular fue evaluada por ensayo de ADN. Brevemente, en cada punto de tiempo, se lavaron 4 trozos de gel de cada grupo con PBS, pH 7,4, se pesaron (peso húmedo), y se cortaron con microtijeras en hielo. El contenido de ADN (N = 4) se midió usando el ensayo PicoGreen (Molecular Probes, Eugene, OR), según las instrucciones del fabricante. Las muestras se midieron fluorométricamente a una longitud de onda de excitación de 480 nm y una longitud de onda de emisión de 528 nm. El contenido de ADN se calculó en base a una curva estándar obtenida en el mismo ensayo, y normalizada además por el peso húmedo de cada trozo de gel.

15 Viabilidad celular: la viabilidad de las hMSCs en los trozos de gel se examinó mediante un ensayo de vida/muerte (Molecular Probes, Eugene, OR). Brevemente, al final del cultivo, un trozo de gel de cada grupo sembrado con hMSCs se lavó con PBS, se cortó de dos mitades, y se incubó en calceína AM 2 mM (que tiñe células vivas) y homodímero de etidio 4 mM (EthD-1, que tiñe células muertas) en PBS durante 30 min a 37°C. Se obtuvieron imágenes de la sección transversal del gel cortado por microscopía Confocal (Bio-Rad MRC 1024, Hercules, CA) con el programa informático Lasershar 2000 (excitación/emisión ~495 nM/~515 nM). Se obtuvieron micrografías de proyección en profundidad a partir de una serie de secciones horizontales, tomadas a diversas distancias unas de otras (incrementos de 1 µm-10 µm), en base a la altura total de una colonia celular bien definida. Se capturaron imágenes fijas a diversas profundidades, y se combinaron después una serie de micrografías para imágenes de compilación "apiladas en z".

25 Histología. Se lavaron en PBS geles de seda sembrados con células y se fijaron en formalina al 10% tamponada a neutralidad durante 2 días antes del análisis histológico. Las muestras se deshidrataron mediante una serie de etanoles graduados, se incrustaron en parafina y se seccionaron a 5 mM de grosor. Para la evaluación histológica, las secciones fueron desparafinizadas, rehidratadas mediante una serie de etanoles graduados, y teñidas con hematoxilina y eosina (H&E).

30 Ejemplo 9. Estadística

Los análisis estadísticos se realizaron usando el test t de Student. Las diferencias se consideraron significativas cuando pp0,05 y altamente significativas cuando pp0,01.

REIVINDICACIONES

1. Un procedimiento para formar rápidamente gelificación de fibroína de seda, que comprende exponer fibroína de seda a un tratamiento que comprende ultrasonificación durante un periodo de aproximadamente 5 segundos a aproximadamente 60 segundos para iniciar la gelificación, en donde se forma gelificación sustancial de la fibroína de seda menos que 24 horas después del tratamiento de ultrasonificación.
2. El procedimiento de la reivindicación 1, en donde la gelificación de la fibroína de seda se forma menos que 2 horas después del tratamiento de ultrasonificación.
3. El procedimiento de la reivindicación 1, en donde la fibroína de seda sufre gelificación en un periodo de tiempo que varía de aproximadamente cinco minutos a aproximadamente dos horas después del tratamiento de ultrasonificación.
4. El procedimiento de la reivindicación 1, 2 o 3, en donde el tratamiento comprende además una disolución salina, en donde la disolución salina comprende opcionalmente iones seleccionados del grupo que consiste en potasio, calcio, sodio, magnesio, cobre, cinc y combinaciones de los mismos.
5. El procedimiento de la reivindicación 1, en donde la fibroína de seda está en la forma de una disolución acuosa que tiene un pH que es aproximadamente pH 4 o inferior o es aproximadamente pH 7,5 o superior.
6. El procedimiento de la reivindicación 4, en donde la sal es potasio, la concentración salina es menos que 100 mM, y el pH de la disolución salina es aproximadamente pH 4 o inferior.
7. Un método para controlar el tiempo de gelificación de fibroína de seda empleando un procedimiento de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en donde la fibroína de seda sufre gelificación sustancial en aproximadamente dos horas.
8. El método de la reivindicación 7, en donde el tiempo de gelificación es controlado mediante la amplitud de la ultrasonificación y la concentración de la disolución de fibroína de seda.
9. El método de la reivindicación 7 u 8, en donde el tiempo de gelificación es controlado mediante la concentración de la disolución de fibroína de seda y la concentración de la disolución salina, y opcionalmente,
- en donde la concentración de la fibroína de seda es 4% en peso o inferior, la disolución salina comprende iones potasio, y la concentración de la disolución salina de potasio varía de 20 mM a 100 mM.
10. El método de la reivindicación 7, en donde el tiempo de gelificación es controlado mediante la concentración y el pH de la disolución salina, y opcionalmente,
- en donde la disolución salina comprende iones potasio, la concentración de la disolución salina de potasio varía de 20 mM a 100 mM, y el pH de la disolución es pH 4 o inferior.
11. Un método para encapsular al menos un agente en fibroína de seda, que comprende:
poner en contacto una disolución de fibroína de seda con un tratamiento de ultrasonificación durante un periodo de aproximadamente 5 segundos a aproximadamente 60 segundos para iniciar la gelificación; y
introducir el (los) agente(s) en la disolución de fibroína de seda antes de que se produzca gelificación sustancial en la disolución de fibroína de seda;
para formar un agente encapsulado en fibroína de seda.
12. Un método para encapsular al menos un agente en fibroína de seda, que comprende:
introducir el (los) agente(s) en una disolución de fibroína de seda; y
poner en contacto una disolución de fibroína de seda con un tratamiento de ultrasonificación durante un periodo de aproximadamente 5 segundos a aproximadamente 60 segundos para iniciar la gelificación;
para formar un agente encapsulado en fibroína de seda.
13. El método de la reivindicación 11 o 12, en donde el agente es un agente terapéutico o un material biológico, o ambos, y/o
en donde el agente es al menos un material biológico seleccionado del grupo que consiste en células, proteínas, péptidos, ácidos nucleicos, APN, aptámeros, anticuerpos, hormonas, factores de crecimiento, citocinas, enzimas, compuestos antimicrobianos, y combinaciones de los mismos, y/o
en donde dicha célula es una célula madre no embrionaria, y/o

en donde se introduce un medio de cultivo celular en la fibroína de seda con el material biológico, y/o

en donde el agente es un agente terapéutico seleccionado del grupo que consiste en moléculas pequeñas, fármacos, y combinaciones de los mismos.

5 14. El método de la reivindicación 12 o 13, en donde se produce gelificación sustancial en aproximadamente 2 horas, y/o

en donde se produce gelificación sustancial en el periodo de tiempo que varía de aproximadamente 5 minutos a aproximadamente 2 horas, y/o

en donde el tratamiento comprende además una disolución salina, y/o

10 en donde la fibroína de seda está en la forma de una disolución acuosa que tiene un pH que es aproximadamente pH 4 o inferior o es aproximadamente pH 7,5 o superior.

15. Un material biológico encapsulado en fibroína de seda obtenible por un método de la reivindicación 12 y 13, para uso como dispositivo de bioentrega.

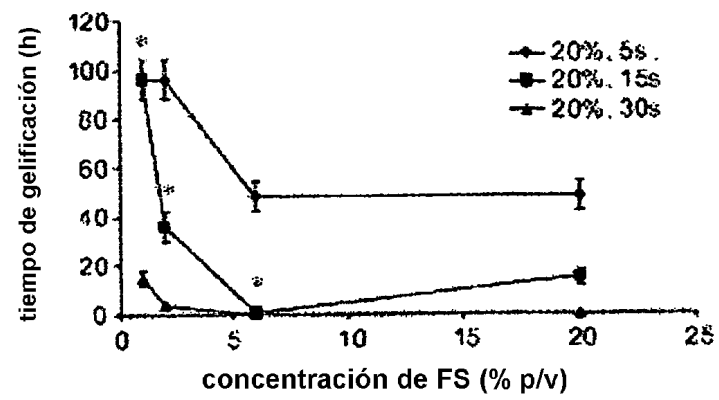
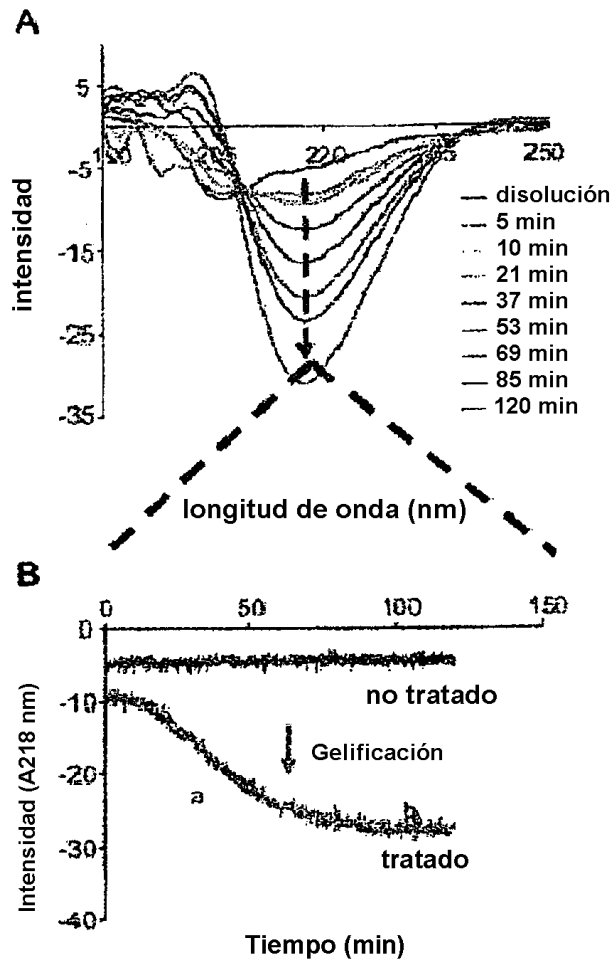


Figura 1



Figuras 2A y 2B

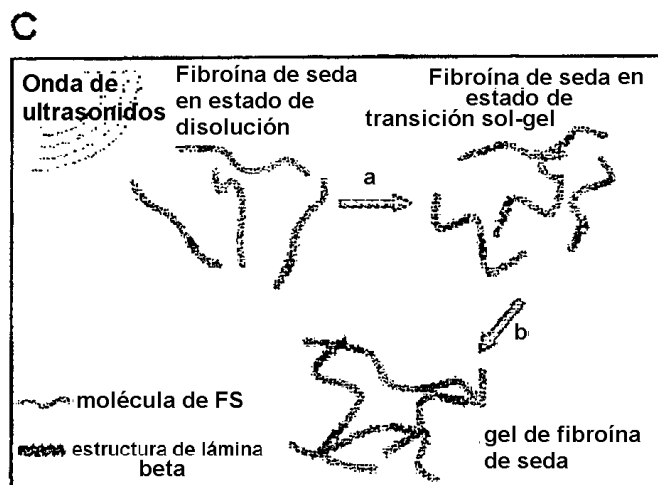


Figura 2C

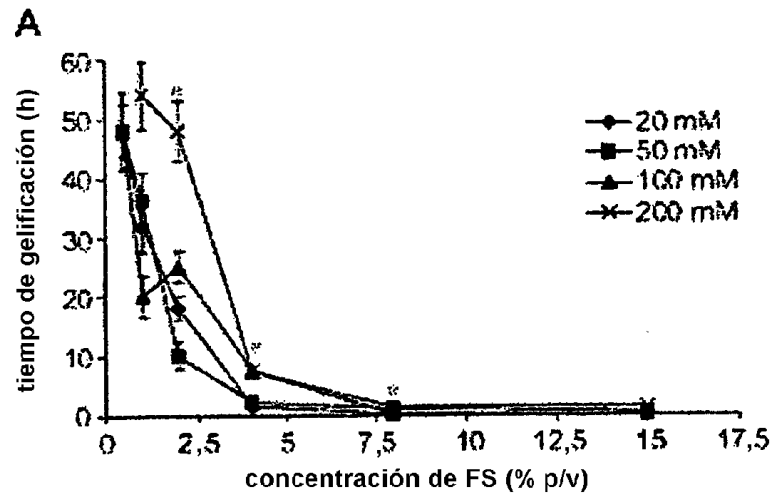


Figura 3A

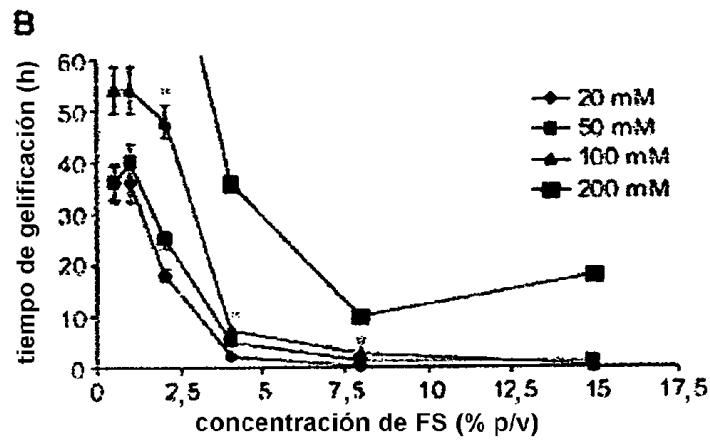


Figura 3B

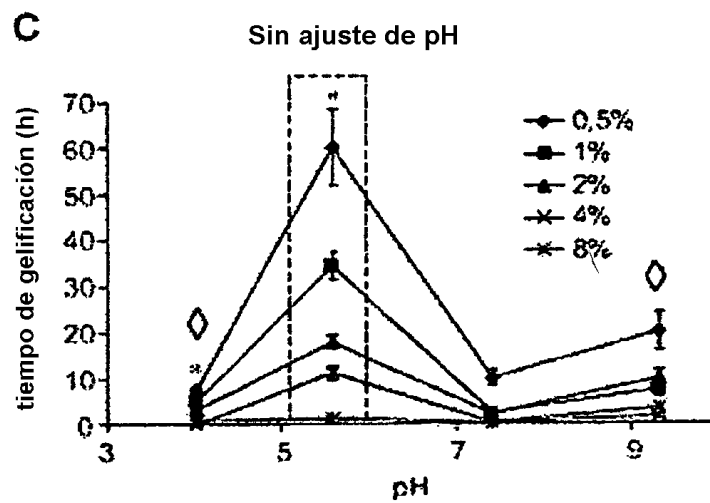


Figura 3C

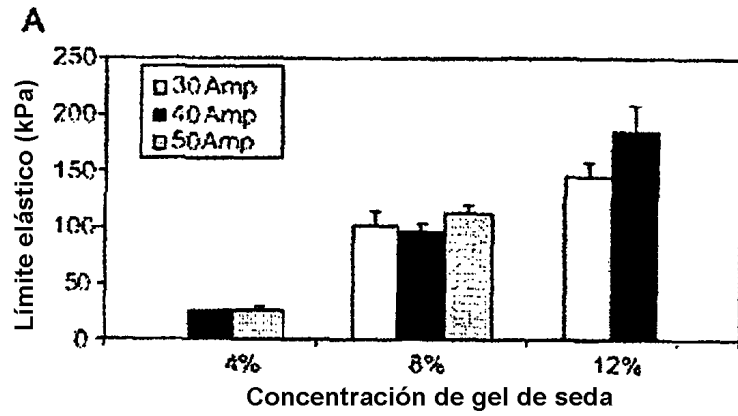


Figura 4A

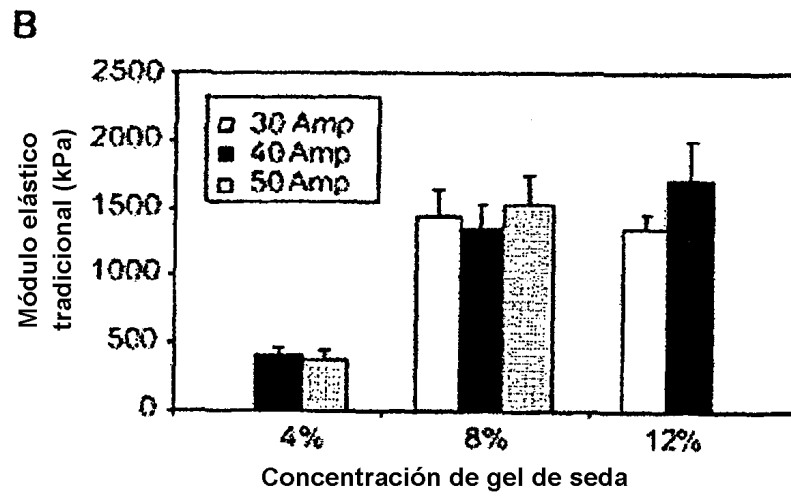


Figura 4B

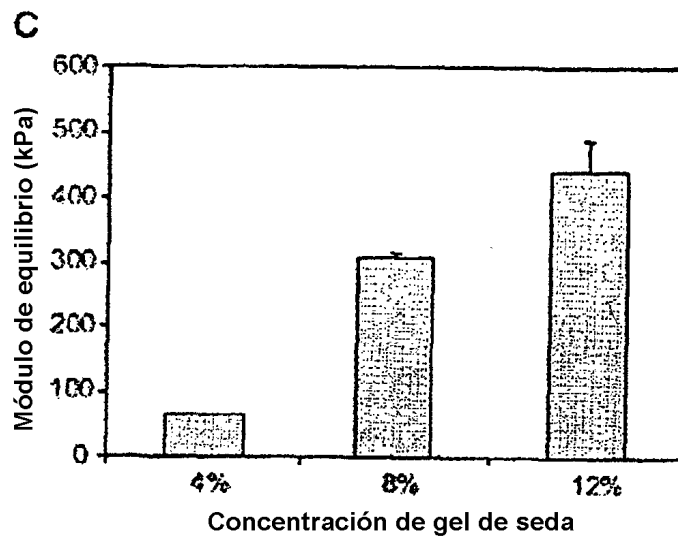


Figura 4C

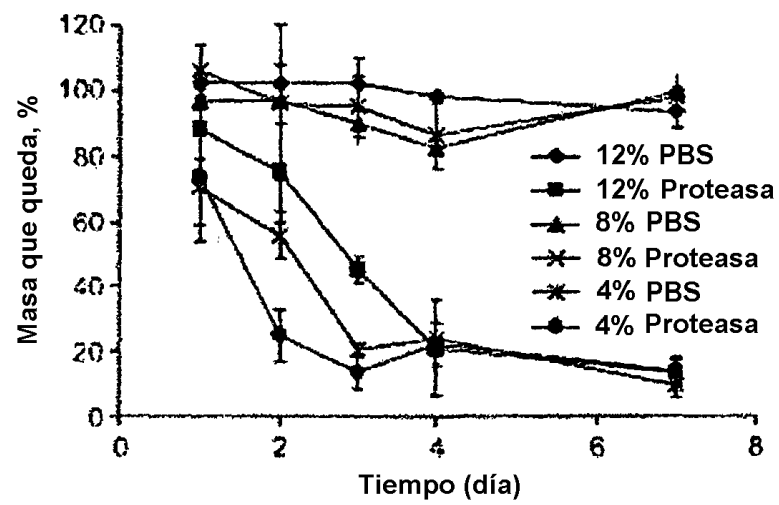


Figura 5

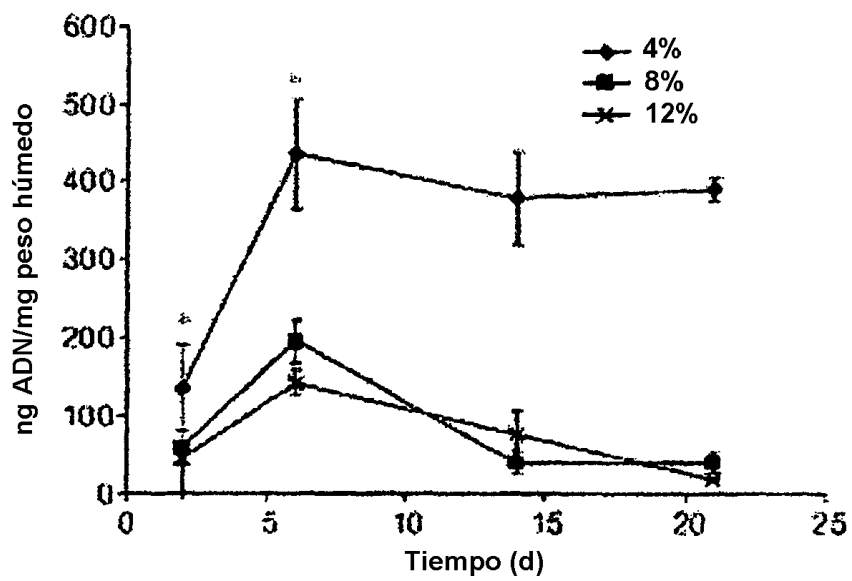


Figura 6