

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 652 171**

51 Int. Cl.:

D06M 11/05	(2006.01) A61L 31/04	(2006.01)
D06M 11/13	(2006.01) D04H 1/00	(2006.01)
D06M 11/155	(2006.01) D04H 1/54	(2012.01)
D06M 11/65	(2006.01) D04H 1/552	(2012.01)
D06M 11/67	(2006.01)	
D06M 13/144	(2006.01)	
D06M 13/188	(2006.01)	
D06M 13/21	(2006.01)	
D06M 13/213	(2006.01)	
D06M 23/14	(2006.01)	

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **27.09.2013 PCT/EP2013/070232**
- 87 Fecha y número de publicación internacional: **03.04.2014 WO14049134**
- 96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **27.09.2013 E 13766564 (2)**
- 97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **13.09.2017 EP 2900861**

54 Título: **Producto fabricado de seda**

30 Prioridad:

27.09.2012 EP 12186272

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

31.01.2018

73 Titular/es:

**MORPHOMED GMBH (100.0%)
Löwengasse 45
1030 Vienna, AT**

72 Inventor/es:

**TEUSCHL, ANDREAS;
VAN GRIENSVEN, MARTIJN y
REDL, HEINZ**

74 Agente/Representante:

CARPINTERO LÓPEZ, Mario

ES 2 652 171 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

Producto fabricado de seda

La presente invención se refiere al campo del procesamiento de material de seda, concretamente, para proporcionar un material de seda para uso médico.

5 Históricamente, durante décadas se ha utilizado la seda en las suturas biomédicas, en las que se han observado posibles respuestas inmunes en el huésped. Esto puede haber sido el principal problema ligado al uso de sedas que ha supuesto que dejen de considerarse para aplicaciones biomédicas en el pasado. La principal causa de que se produzca la activación de una respuesta inmune se ha asociado con la sericina. Por lo tanto, una eliminación adecuada de la sericina de la seda cruda es una etapa crucial para la preparación de seda para aplicaciones de ingeniería de tejidos y de medicina regenerativa para evitar problemas de biocompatibilidad.

10 La seda del gusano de seda común se obtiene de los capullos de las larvas del gusano de seda *Bombyx mori*. La fibra simple del capullo del gusano de seda consiste en dos núcleos de fibroína rodeados de una proteína de tipo adhesivo denominada sericina, que fija las fibras de fibroína entre sí. La fibroína y la sericina representan aproximadamente el 75 y el 25 % en peso, respectivamente.

15 Morfológicamente, la fibroína de la seda se caracteriza por una estructura fibrosa cristalina y altamente orientada. Dicha estructura es la responsable de su insolubilidad en la mayoría de los disolventes, como puedan ser agua, etanol, ácidos y bases diluidos. A diferencia de la fibroína, la proteína globular sericina es muy soluble en disolventes acuosos. En la industria textil, la eliminación de la sericina también reviste un gran interés, ya que el lustre de las telas de seda se tapa con la sericina. Por consiguiente, los grupos de investigadores que trabajan en la seda no se limitan al campo del biomaterial, sino que también los investigadores de la industria textil buscan procedimientos de desgomado óptimos. Esto ha supuesto la existencia de diversos procedimientos de desgomado, entre los que se incluyen soluciones alcalinas con o sin detergentes, urea, ácido tartárico, ácido cítrico o enzimas, como papaína o endopeptidasa. La manera clásica de desgomado es hervir la seda cruda en soluciones alcalinas con o sin detergentes que ayudan a eliminar la sericina de la estructura fibrosa. Debe subrayarse que está extendido el uso de una solución de carbonato sódico 0,02 M a 100 °C durante 30-60 minutos para llevar a cabo el desgomado, especialmente, en el campo de la investigación de ingeniería de tejidos. Frecuentemente, dicho desgomado alcalino se lleva a cabo en un tratamiento discontinuo utilizando jabones o detergentes además del álcali.

La producción de seda industrial implica generalmente disolver las fibras naturales en una solución de fibroína y reprocesar las fibras desde esta solución a través de tratamientos adecuados, como por ejemplo hilado.

30 Para los usos médicos del material de seda se emplean casi exclusivamente la disolución de las fibras de seda en sistemas acuosos como LiBr o CaCl₂/EtOH/agua en una relación molar de 1:2:8 (CN 101736430 B), seguido del reprocesamiento de la solución de seda en los formatos del material que se deseen, p.ej., por hilado, electrohilado, colada desde sistemas de disolvente acuoso u orgánico, gelación, espumación, etc. (Vepari y col., 2007, patente estadounidense US 5,252,285 A; Sung-Won Ha y col., Biomacromolecules 4(3) 2003 p.488-496).

35 Sin embargo, estos materiales de seda reprocesados a partir de soluciones de fibroína difieren de las estructuras de la seda natural (nativa) generalmente, con el resultado de productos tridimensionales con propiedades (sobre todo las propiedades mecánicas) que no son satisfactorias para muchos posibles usos, sobre todo, dentro del campo de la cirugía.

40 Para evitar esta reducción de las propiedades de las estructuras de seda resultantes, se requieren técnicas que empleen fibras de seda desgomada como materia prima. Horan y col. (J Biomech 39(12) 2006, p.2232-2240) ha demostrado la alta procesabilidad de las fibras de seda con técnicas de ingeniería textil como trenzado, anudado, tejeduría, etc. sobre todo en el campo de los productos biomédicos. A pesar de las mejoras que se pueden conseguir utilizando técnicas de ingeniería textil para la producción de matrices, existen casos especiales en los que puede ser beneficioso introducir la unión de fibras que no se pueden conseguir o difíciles de obtener con técnicas de ingeniería textil. Por lo tanto, se han desarrollado diferentes estrategias con las que se unen fibras naturales, así como fibras sintéticas, empleando disolventes, adhesivos (embebido en resinas) o aplicando calor (patente estadounidense US 3 510 390 A). Uno de los enfoques para conseguir dicha unión de las fibras de seda con las adyacentes es el uso de líquidos iónicos. Dichos líquidos iónicos sirven como disolvente para muchos biopolímeros, incluyendo seda. Por ejemplo, Haverhals y col. (Macromolecular materials and engineering 295, 1 enero de 2010, p.425-430) pudieron demostrar que mediante el uso de acetato de 1-etil-3-metilimidazolío es posible "soldar" fibras de seda nativas y sin desgomar entre sí. Este procedimiento se describe y se expone con el resultado de uniones superficiales de fibras con estructuras no interrumpidas o no disgregadas (patente estadounidense US 8 202 379 B1).

55 Otro reactivo químico que se ha utilizado para adherir fibras de seda entre sí es ácido fórmico. Ya en el año 1915, se describió en un procedimiento para producir pulpa de fibra uniforme a partir de fibras de seda cortas (patente británica GB 12374 A). En el campo de la biomédica, Ghanaati y col. (JTERM, 2010 (4) p.464-472) utilizaron ácido fórmico para unir fibras de seda desgomadas y no tejidas entre sí para conseguir matrices estables que se pueden implantar, pero sin crear una fase continua de fibras de seda fusionadas.

Es evidente que los biomateriales, específicamente los que se implantan, deben tener una significativa estabilidad mecánica, sobre todo para resistir las fuerzas de presión y se ha de evitar o excluir cualquier derrumbamiento no intencionado de dicho material. Por tanto, se necesitan procedimientos mejorados para proporcionar biomateriales robustos a base de seda con mejores propiedades mecánicas y morfológicas. Dichos procedimientos deberían permitir un procedimiento de producción robusto, reproducible y seguro; por otra parte, los productos deben permitir que los biomateriales producidos se puedan aplicar especialmente en medicina y en procedimientos de cultivo de células.

Por lo tanto, un objeto de la presente invención es proporcionar dicho procedimiento; dicho procedimiento deberá ser específicamente adecuado para fines médicos, sobre todo, para terapia y cirugía.

Por lo tanto, la presente invención proporciona un procedimiento para la producción de productos de seda tridimensionales, en el que se trata un producto de seda tridimensional con un disolvente de seda durante un período de tiempo limitado para obtener la disgregación parcial del producto de seda, tras lo cual se restablece el producto de seda parcialmente disgregado con inducción de lámina β física, por tratamiento con una solución de restablecimiento, en la que la solución de restablecimiento es ácido fórmico, preferentemente de 90 a 100 % de ácido fórmico, especialmente de 97 a 99 % de ácido fórmico.

Dentro de la presente invención, “los productos de seda tridimensionales” no solamente han de entenderse como productos en los que ninguna de las tres dimensiones es irrelevante con respecto a las otras dos, sino como productos que se definen como al menos un apilamiento de dos capas de fibroína, una capa de fibroína homogénea (región, área, fase, etc.) y una capa de fibroína fibrosa que permite estéricamente la generación de propiedades materiales anisotrópicas.

El procedimiento de acuerdo con la presente invención proporciona construcciones de seda, especialmente construcciones de fibroína, con mejores propiedades mecánicas. Esto permite la implantación de los productos que se pueden obtener a través del procedimiento de la presente invención *in vivo* en regiones en las que están expuestos a influencias mecánicas concretas. Por ejemplo, en el caso de un conducto nervioso, los implantes *in vivo* pueden quedar expuestos a fuerzas de presión que pueden causar el derrumbamiento de dichos implantes. En tal caso, un tubo (tejido) de fibroína sin tratar podría derrumbarse y obstaculizar un nervio en crecimiento cubierto con dicho tubo. El procedimiento de acuerdo con la presente invención permite proporcionar trasplantes que resisten dichas fuerzas que causan el aplastamiento o la contusión. Si bien, la etapa de disgregación, así como la etapa de restablecimiento se han llevado a cabo antes en construcciones de fibroína sin obtenerse productos con las propiedades ventajosas según la presente invención, es la combinación de estas dos etapas la que tiene como resultado mejores propiedades de los productos de acuerdo con la presente invención.

La etapa de disgregación parcial de acuerdo con la presente invención puede observarse como una fusión parcial del producto de seda en el área expuesta a la solución de disgregación, el disolvente de seda. Esto implica una desorganización parcial de la estructura de lámina beta de la fibroína, que hace moldeable la fibroína. La disgregación se puede llevar a cabo en el grado que se desee para el producto final, p.ej., solamente próximo a la superficie o a través de todo el producto de seda, naturalmente, sin transformar el producto en una solución. La forma general del material de partida (es decir, el producto de seda) se retiene esencialmente a lo largo de la etapa de disgregación parcial. Por lo tanto, el disolvente de seda se aplica únicamente durante un período de tiempo limitado y no hasta que se complete la solvatación (y que se consiga un equilibrio). De acuerdo con la presente invención, no tiene lugar una completa licuefacción del material de seda (fibroína) (de nuevo) en una suspensión o suspensión, únicamente un proceso de des-solidificación parcial en un área limitada del producto. Esta etapa de “fusión” (parcial) permite un empaquetamiento más denso de las moléculas de fibroína en la zona disgregada del producto caracterizada por la formulación de una fase continua. El grado en el que se permite que tenga lugar la etapa de disgregación en el producto de seda es responsable pues de las diferentes características de producto del producto final de acuerdo con la presente invención.

Por lo tanto, es evidente que “disgregación” de acuerdo con la presente invención es claramente diferente de otras etapas de tratamiento de la seda, como desgomado (“desgomado” se referiría a la separación de dos clases de proteínas entre sí – es decir, se separa sericina de fibrillas de fibroína – que es similar a la eliminación de la cubierta exterior desde un núcleo).

En la etapa de restablecimiento, se solidifica la porción disgregada del producto de seda de nuevo, si bien, tiene como resultado un área con diferentes propiedades morfológicas y mecánicas que la parte no disgregada del producto de seda. Con la etapa de restablecimiento, se solidifica otra vez completamente el producto de seda, pero habitualmente, el resultado es un producto final anisotrópico en el que la superficie que ha sido predominantemente expuesta a la solución de solubilización de seda experimenta el cambio estructural más extenso, mientras que las porciones interiores del producto de seda (o la superficie que no ha sido expuesta a la solución de solubilización (“disolvente de seda”)) podría permanecer prácticamente sin cambios o al menos sin cambiar en el grado en que lo ha hecho la zona expuesta al disolvente de seda. La etapa de restablecimiento de acuerdo con la presente invención es por tanto la inducción de un estado de tipo cristalino morfológico. La etapa de restablecimiento se realiza por inducción de lámina β física. La disgregación ha provocado una estructura “aleatoria” de la seda. Por consiguiente, la seda disgregada se trata físicamente para que se vuelva a plegar en lámina β . Una manera habitual de llevar a cabo

esta etapa es eliminar las moléculas de agua de las zonas disgregadas dentro de la forma de seda aleatoria hasta que tiene lugar dicho re-plegamiento.

La fibroína de seda es un material polimorfo que existe en tres fases diferentes, identificadas comúnmente como seda I, II y III. La seda I representa un estado de estructuras helicoidales y de arrollamiento aleatorio que es hidrosoluble y que se puede encontrar en las glándulas del gusano de seda antes del proceso de hilatura o como solución de seda (acuosa) (también conocida como seda regenerada). La seda II se caracteriza por estructuras en láminas β asimétricas en las que están expuestas las cadenas laterales de hidrógeno de glicina principalmente en un lado de la lámina β y la cadena lateral metilo hidrófoba de alaninas en la otra. Como consecuencia, las láminas β se montan alineándose unas al lado de otras, estabilizadas por fuertes uniones de hidrógeno y fuerzas de van der Waals.

Con la exposición a calor o fuerzas de cizalla, se induce un cambio estructural de la seda I en la seda II. Esta transición de fase puede conseguirse también por tratamiento de las estructuras de seda con metanol u otros reactivos que promueven la pérdida de agua de las moléculas de seda. Como consecuencia se induce la transición desde un arrollamiento aleatorio (seda I) a una formación en lámina β (seda II) a través de la potenciación de las interacciones cadena-cadena. Además de la transición de fase, este procedimiento también garantiza estructuras de seda estables al agua. Otros procedimientos para inducir y controlar la formación de lámina beta son el autoclaveado con vapor (Park y col., J. Mat. Sci 43 (2008), 6967-6985) procedimientos de recocido en agua (Hu y col., Biomacromol. 12 (2011), 1686-1696).

La etapa de restablecimiento se lleva a cabo preferentemente de acuerdo con la presente invención por tratamiento con una solución de restablecimiento. También se pueden aplicar combinaciones de diferentes soluciones de restablecimiento.

El restablecimiento por tratamiento con una solución de restablecimiento puede llevarse a cabo con cualquier solución que consiga la formación de lámina β de la seda. Dicha cristalinidad (restablecimiento por tratamiento con una solución de restablecimiento) se induce normalmente a través de los dos procedimientos entre los procedimientos industriales actuales, cada uno de ellos por inmersión de un alcohol, como metanol o etanol. La inmersión en alcohol es simple y rápida, aunque si es necesario evitar el uso de un alcohol, es posible empelar soluciones de restablecimiento sin alcohol como ácido fórmico.

Como sistema de prueba para la presente invención, se investigaron las estructuras de control de fibroína de seda para la reparación nerviosa. Más específicamente, se observó la superación del defecto del nervio isquiático en ratas *in vivo* y presentó sorprendentes resultados (véase sección de los ejemplos).

En el curso de la presente invención, se observó de manera sorprendente que los productos de seda, especialmente los productos de fibroína tridimensionales, pueden mejorarse eficientemente en lo que se refiere a sus propiedades mecánicas, sobre todo, su resistencia contra el derrumbamiento después de la implantación *in vivo*, con la aplicación de dos etapas de tratamiento de acuerdo con la presente invención. Esto permite la producción de un producto de seda tridimensional con significativas ventajas y posibilidades en comparación con las fibras de seda que se han reprocesado desde soluciones de fibroína (que no tienen esta etapa de reforzamiento de acuerdo con la presente invención).

La provisión de estructuras de seda complejas más robustas de acuerdo con la presente invención proporciona una significativa ventaja en la cirugía moderna. Asimismo, los procedimientos de producción en conjunto son seguros y adecuados para la producción industrial a gran escala.

Preferentemente, el disolvente de seda de acuerdo con el procedimiento de la presente invención comprende LiBr, LiSCN, hexafluoro-2-propanol (HFIP), una a mezcla que comprende etanol y CaCl_2 o una mezcla que comprende metanol y nitrato cálcico; o mezclas de los mismos. De acuerdo con una realización preferente, se utiliza LiBr en el disolvente de seda en una concentración de 1 a 10 M, preferentemente, de 3 a 10 M, especialmente de 5 a 7 M. De acuerdo con una realización preferente, se utiliza LiSCN en una concentración de 1 a 17,5 M, preferentemente de 5 a 15 M, especialmente de 8 a 12 M. De acuerdo con una realización preferente, se utiliza HFIP en una solución que contiene de 1 a 100 % (v/v), preferentemente de 50 a 100 % (v/v) de HFIP, especialmente de 90 a 100 % (v/v) de HFIP. Se puede utilizar etanol p.ej., en el disolvente de seda en una solución acuosa que contiene de 1 a 50 % (v/v) de etanol, preferentemente de 5 a 40 % (v/v) de etanol, especialmente de 10 a 30 % (v/v) de etanol. Se puede utilizar CaCl_2 p.ej. en el disolvente de seda en una relación molar de 1:0,3 a 1:3 con respecto al etanol (es decir, 1 mol CaCl_2 :0,3 moles EtOH 1 mol CaCl_2 :3 moles EtOH), preferentemente 1:1 a 1:2,5., especialmente 1:1,5 to 1:2,2.

El procedimiento de la presente invención se puede aplicar a una inmensa gama de productos de seda diferentes, especialmente, productos de fibroína. Preferentemente, el producto de seda tridimensional es una tela tejida, una tela no tejida, un tubo, un producto e punto o un producto prensado. Si bien el procedimiento de acuerdo con la presente invención se puede llevar a cabo con cualquier andamio de seda, el procedimiento es adecuado específicamente para el tratamiento de matrices fabricadas de fibras de seda. Dichos productos se pueden transformar en matrices de seda con una región en la que tiene lugar la disgregación y regiones en las que está todavía presenta la estructura de la fibra de seda original, preferentemente proporcionando un producto anisotrópico,

es decir, un producto con una superficie que ha sido disgregada y una porción interior que todavía contiene las fibras de seda. Específicamente es preferente el uso de un producto de fibroína de seda o un producto tejido de fibras de seda naturales. Los materiales de partida preferentes para el procedimiento de acuerdo con la presente invención son p.ej., tubos de seda (p.ej. los producidos por Lovett y col., *Biomaterials* 29 (2008), 4650-4657; patente estadounidense US 2008/249639 A1; Ghaznavi y col., *Ann.Pl.Surg.* 66 (2011), 273-279), telas de seda (p.ej. las producidas según la patente internacional WO 02/29141 A1) o membranas de seda (p.ej. patente estadounidense US 2010/286774 A1).

El material de seda puede tomarse desde todas las fuentes naturales y sintéticas; sin embargo, preferentemente se utilizan productos de seda que están fabricados o que se derivan de fibras de seda naturales de los capullos de los gusanos de seda (*Bombyx mori*). Estas fibras (en su forma natural o ya desgomadas (es decir, después de separar la sericina de las fibras)) o bien se pueden utilizar como fibras naturales para producir el producto de seda como material de partida para el procedimiento de la presente invención o bien se transforman en una solución de fibroína y se reprocesan a continuación (p.ej., o hilado) de nuevo en una fibra (fibroína) y un producto de fibroína. La fuente industrial principal para las fibras de seda es, sin lugar a dudas, el gusano de seda *Bombyx mori*, sin embargo, es posible utilizar también las fibras de seda de otros gusanos de seda (Lepidópteros) en el procedimiento de acuerdo con la presente invención. Los gusanos de seda se pueden distinguir generalmente entre gusanos de seda que se alimentan de morera (*Bombyx mori*, *Bombyx mandarina*) y los que no se alimentan de morera (*Antheraea* (*A.*) *mylitta*, *A. proylei*, *A. pernyi*, *A. yamamai*, *A. frithi*, *A. assamensis*, *Samia ricini*, *A. atlas*, *Gonometa postica*, *Cricula trifenestrata*). La similitud del patrón de composición de aminoácidos de la sericina extraída entre los gusanos de seda silvestres y los gusanos de seda domesticados es al menos 97 %, lo que demuestra el alto número de secuencias de aminoácido conservadas entre diferentes especies de gusanos de seda (Mondal y col., *Caspian J. Env. Sci.* 5 (2007), 63-76) y sirve como indicación de que el procedimiento descrito también se puede aplicar a otras fuentes de seda.

Por otra parte, es posible que sea preferente aplicar el procedimiento de acuerdo con la presente invención sobre un producto de seda que esté fabricado de fibras reconstituidas de soluciones de fibroína, especialmente soluciones de fibroína recombinantes.

El procedimiento de acuerdo con la presente invención ha sido optimizado específicamente para productos que están fabricados con fibras de seda del gusano de seda *Bombyx mori*. Se trata asimismo de la misma fuente industrial de fibras de seda nativas para la industria textil. Sin embargo, tal como se ha señalado ya, también es posible utilizar otras fibras de seda, tales como las derivadas de orugas de polillas y arañas tejedoras (como *Nephila clavipes*) para la producción de productos de seda de acuerdo con la presente invención. Asimismo, es posible aplicar el procedimiento de la presente invención a un producto de seda tridimensional que contenga - además del material de seda (fibras) - también otras sustancias que se emplean para proporcionar materiales biocompatibles como PEG, gelatina, colágeno, ácido hialurónico, quitosano, etc., siempre y cuando se apliquen las etapas del procedimiento a estas combinaciones individuales sin destruir sustancialmente la forma tridimensional del producto.

Las fibras de seda nativa preferentes sobre todo son las del capullo del gusano de seda *Bombyx mori*. Las fibras de seda del gusano de seda *Bombyx mori* tienen una sección transversal triangular con las esquinas redondeadas de 5-10 µm de anchura. La cadena pesada de fibroína está compuesta sobre todo de láminas beta, debido a la secuencia de repetición de aminoácidos de 59 elementos con algunas variaciones. Las superficies planas de las fibrillas reflejan la luz en muchos ángulos dando a la seda un brillo natural. La sección transversal de otros gusanos de seda puede variar en la forma y el diámetro: de tipo media luna para los Anaphe y de cuña alargada para los Tussah. Las fibras de los gusanos de seda se extruyen de manera natural desde dos glándulas de los gusanos de seda como un par de filamentos primarios (brin) que se adhieren entre sí, con proteínas de sericina que actúan como cola para formar un hilo de seda (bave). Los diámetros de los hilos de seda para la seda Tussah pueden alcanzar los 65 mm.

Los productos de seda preferentes para su fabricación con el procedimiento de acuerdo con la presente invención son implantes médicos, preferentemente un stent, un conducto nervioso, un andamio de tejido (p.ej. tendón, bronquios, tráquea, etc.), una malla para hernia, una ligadura, especialmente un ligamento cruzado anterior (LCA), o un cartílago e injerto óseo.

Con el procedimiento de acuerdo con la presente invención, es posible proporcionar productos de seda anisotrópicos, es decir, productos que tienen propiedades del material de seda que cambian según los diferentes lados o en diferentes zonas o dentro de un producto dado. El producto de seda tridimensional anisotrópico de acuerdo con la presente invención se caracteriza por al menos un apilamiento de dos capas ("fases", "regiones", "zonas") de filamentos de fibroína que permite estéricamente la generación de propiedades del material anisotrópicas. El material tridimensional de acuerdo con la presente invención se caracteriza también por una fase de fibroína homogénea (continua) (la región en el producto que ha sido solvatada y que se reestablece después), que no contiene cavidades ("cavidades atrapadas") o al menos por debajo de un 5 % v/v de cavidades atrapadas y una fase de fibroína fibrosa (la regiones en la que no se disuelven las fibras de seda) que no es continua, pero que se caracteriza por la naturaleza fibrosa de las fibras de seda (véase Figs. 11E-11I en contraposición a la Fig. 13 en la que se muestran productos de la técnica anterior sin fase de fibroína homogénea (sino estructuras de naturaleza filamentosa ("fibras apiladas", "filamentos continuos", etc.)); la barra roja de las Figs. 11E-11I que muestra el espesor de la fase homogénea en los productos de acuerdo con la presente invención).

Los productos de acuerdo con la presente invención pueden ser anisotrópicos, al tener una capa exterior que es continua y una capa interior que es filamentosa. Es posible que solamente el núcleo interior del producto esté presente en forma filamentosa, al tiempo que la superficie del producto en su totalidad sea homogéneo, o incluso el producto entero no sea filamentoso y de forma homogénea y continua. Se puede proteger del disolvente de seda y la solución de restablecimiento la zona de la superficie del producto que no deberá ser homogénea durante el procedimiento, p.ej. por recubrimiento físico o protección química.

Esto se puede conseguir, p.ej., dirigiendo la solución de solubilización solamente a un lado del producto de seda de manera que solamente se trate uno de los lados de acuerdo con la presente invención, al tiempo que el otro lado no queda sujeto a dicho tratamiento. El resultado es pues un producto con dos superficies diferentes que tienen diferentes propiedades (p.ej., un lado mantiene las propiedades sin tratar y el otro lado presenta las propiedades de los productos de seda de acuerdo con la presente invención). También es posible proporcionar propiedades anisotrópicas a un producto dando paso a la disgregación parcial hasta cierta "profundidad" del producto de seda, de modo que la parte interior de los productos de seda retiene la naturaleza no tratada y únicamente la superficie (hasta la "profundidad" que se desee) presenta las propiedades cambiadas deseadas de acuerdo con la presente invención (véase p.ej. Fig. 2). Dado que el procedimiento de acuerdo con la presente invención permite llevar a cabo el tratamiento con el disolvente de seda para una disgregación parcial, p.je., durante periodos más cortos o más largos (o cambiando otros parámetros del tratamiento, como puedan ser la temperatura, la concentración o las sustancias químicas del proceso, etc.), puede dirigirse la "profundidad" hasta la que tenga lugar la disgregación. Por ejemplo, cada producto de seda puede tratarse o bien durante un periodo de tiempo corto (con una disgregación de la superficie inmediata y un reforzamiento inmediato a través de la etapa de restablecimiento) o durante extensos periodos de tiempo (permitiendo que la mayoría del producto de seda se disgregue en la primera etapa (y se refuerce a través de la etapa de restablecimiento de acuerdo con la presente invención, que se lleva a cabo siempre una vez realizada la disgregación, preferentemente, inmediatamente después)).

En general, los productos tridimensionales de acuerdo con la presente invención son estructuras tridimensionales complejas que tienen un diámetro en la dimensión más reducida posible ("espesor") de al menos 0,1 mm, preferentemente 0,5 mm. Teóricamente, también es posible un espesor de 10-15 μm sin embargo, tales realizaciones suelen ser poco prácticas. Asimismo, se pueden llevar a cabo plegando, soldando o formando tubos de productos tridimensionales más simples. De hecho, los productos tridimensionales preferentes de acuerdo con la presente invención tienen un diámetro en la dimensión más reducida de al menos 1,0 mm, preferentemente al menos 2,0 mm, especialmente, al menos 5,0 mm.

Los parámetros de proceso para la etapa solubilizante y las etapas de restablecimiento pueden optimizarse fácilmente para el producto en concreto que se vaya a obtener de forma reproducible. Las temperaturas, el tipo y las concentraciones de los productos químicos de disgregación y restablecimiento y las duraciones de tratamiento se pueden adaptar para cada producto dependiendo de la cantidad de disgregación y el grado de reforzamiento que deba tener el producto final. Por ejemplo, el tratamiento con un disolvente de seda se puede llevar a cabo a una temperatura de 20 a 100 °C, preferentemente de 50 a 78 °C, especialmente de 70 a 77°C. Las realizaciones preferentes aplican una duración de tratamiento con un disolvente de seda p.ej. durante 1 s a 2 h, preferentemente 1 s a 0,5 h, especialmente 10 s a 30 min. El tratamiento con una solución de restablecimiento puede llevarse a cabo p.ej., durante 1 s a 1h, preferentemente 5 min a 1 h, especialmente 20 min a 30 min. Naturalmente, es evidente que la temperatura aplicada y el periodo de duración dependen uno del otro y han de ajustarse entre sí de forma individual para una situación de producción dada (una temperatura más alta suele permitir tiempos de reacción más cortos).

El agente de restablecimiento es ácido fórmico. El ácido fórmico es un disolvente de seda conocido, así como un agente de cristalización de la seda (Um y col. Int. J. Biol. Macromol 33 (2003) 203-213). En el agente de restablecimiento de acuerdo con la presente invención, el ácido fórmico actúa como disolvente débil que provoca la estructura arrollada aleatoriamente del ácido fórmico que, a su vez, conduce a un radio hidrodinámico de las moléculas de fibroína de la seda. Esto lleva a un empaquetamiento ordenado previamente/más denso antes de la cristalización. La cristalización final se puede conseguir entonces a través de procedimientos conocidos en la técnica (y preferentes sobre todo) p.ej., por tratamiento con metanol. El agente de restablecimiento es, tal como se ha señalado anteriormente, ácido fórmico, preferentemente de 90 a 100 % de ácido fórmico, especialmente de 97 a 99 % de ácido fórmico. Una realización específicamente preferente de la presente invención aplica 98 % de ácido fórmico que es un compuesto químico básico perfectamente definido.

En el procedimiento de acuerdo con la presente invención, se disuelven las fibras de seda con el disolvente de seda para obtener un producto tridimensional con una región en la que las fibras de seda se han disuelto y en la que, por tanto, la fibroína está presente como arrollamientos aleatorios. La solución de restablecimiento, especialmente ácido fórmico, induce entonces la formación de láminas β (fase continua); se estabiliza la fibroína mediante esta formación de lámina β . El tratamiento posterior preferente con agentes de cristalización, sobre todo metanol, lleva a la estabilización de la fase de fibroína continua que es insoluble en agua.

Una realización específicamente preferente de la presente invención es un procedimiento en el que el disolvente de seda es una combinación de CaCl_2 , etanol y agua, en el que el producto de seda disgregado parcialmente se restablece con ácido fórmico y en el que el producto así obtenido se trata además con metanol como etapa de

restablecimiento final. Esta combinación de etapas da lugar a un producto con unas propiedades mecánicas significativamente mejoradas (véase p.ej. Fig. 3).

De acuerdo con una realización preferente, se proporciona el producto de seda tridimensional con un material que no es seda que se puede volver a solvatar y que se puede separar del producto restablecido, preferentemente, en la que el material que no es seda que se puede volver a solvatar consiste en polímeros (p.ej., polietilén glicol), polisacáridos/azúcares, sales o, en general, cualquier sustancia utilizada como porógeno soluble. Este material puede solvatar de nuevo después de que se haya disgregado el producto de acuerdo con la presente solicitud para dejar espacios en el producto que pueden utilizarse como compartimentos para células o sustancias farmacéuticamente activas o que proporcionan espacios para el crecimiento de tejido, p.ej., vasos sanguíneos, especialmente capilares.

De acuerdo con una realización preferente de la presente invención, el producto de seda está equipado con otras moléculas activas. Gracias a dichas moléculas activas se pueden añadir importantes y valiosas características al producto de seda de acuerdo con la presente invención. Por ejemplo, se pueden añadir moléculas con propiedades de promoción de la adhesión celular (o propiedades de prevención de la adhesión celular) al producto de seda. Un producto de seda tridimensional preferente comprende además sustancias que promueven la adhesión celular, preferentemente, péptidos de unión a células, especialmente Arg-Gly-Asp ("RGD"); proteínas de promoción de la adhesión celular, especialmente, proteína SF, gelatina, fibronectina o lectina. Preferentemente, el producto de seda tridimensional comprende además polipéptidos modificados que promueven la adhesión celular, especialmente péptidos de RGD modificados, proteína SF, gelatina, fibronectina o lecitina. En general, la promoción de la adhesión celular en las superficies de biomateriales reviste un gran interés para aplicaciones de ingeniería de tejidos. Se han realizado muchas tentativas para adaptar las superficies del material con moléculas bioactivas, como por ejemplo, secuencias de péptidos de unión a células, incluyendo arginina-glicina-ácido aspártico o sustancias derivadas de biomoléculas como gelatina o fibronectina, para mejorar la adhesión celular (Rowley y col., *Biomat.* 20 (1999), 45-53; Liu y col., *J. Biomed. Mat. res. A* 74 (2005), 84-91). SF es una proteína de más de 5000 aminoácidos (número de acceso P05790) compuestos principalmente de motivos repetitivos de glicina y alanina. No obstante, SF no contiene una fracción suficiente de aminoácidos reactivos, como ácido aspártico y glutámico, tirosina, serina y treonina, todos ellos accesibles para modificaciones químicas (Murphy y col., *J. Mat. Chem.* 19 (2009), 6443-6450). Por ejemplo, se ha utilizado la química de unión de carbodiimida para acoplar fibroína de seda con proteína 2 morfogenética del hueso (BMP-2) para inducir la formación de hueso (Karageorgiou y col., *J. Biomed. Mat. Res. A* 71 (2004), 528-537), y péptido RGD para promover la fijación de las células (Kardestuncer y col., *Clin. Orthop. Rel. Res.* 448 (2006), 234-239). Otras moléculas que se pueden utilizar para decorar la fibroína de seda y mejorar la adhesión de las células son lectinas, diversas formas de secuencias RGD, motivos de unión similares a colágeno, fibronectina u otras proteínas naturales.

De acuerdo con otro aspecto, la presente invención se refiere también a productos de seda tridimensionales que se pueden obtener a través de un procedimiento de acuerdo con la presente invención.

Tal como se ha señalado anteriormente, estos productos tienen unas mejores propiedades mecánicas, sobre todo, una mejor resistencia contra la presión o las fuerzas de aplastamiento. Esto hace que los productos de acuerdo con la presente invención sean específicamente adecuados para proporcionar dispositivos médicos en forma tubular, especialmente, tubos de implantación *in vivo*, como injertos vasculares o conductos nerviosos u otras matrices. Por consiguiente, los productos preferentes de acuerdo con la presente invención son stents, injertos vasculares, conductos nerviosos, mallas para hernias o cualquier otro andamio para aplicaciones de ingeniería de tejidos o medicina regenerativa.

El grado en el que se lleve a cabo la disgregación parcial en el producto de seda de acuerdo con la presente invención (y, naturalmente, el posterior restablecimiento de estas regiones disgregadas en el producto) se puede dirigir exactamente a través del procedimiento de acuerdo con la presente invención, preferentemente, según el período de tiempo que dure el tratamiento con el disolvente de seda. Por ejemplo, un tratamiento de aproximadamente 20 segundos lleva a una profundidad de disgregación de aproximadamente 50 µm; un tratamiento de 40 segundos lleva a una disgregación de aproximadamente 100 µm desde la superficie del producto que está expuesta al disolvente de seda. Naturalmente, la superficie del producto de seda que se expone al disolvente de seda se disgrega completamente. La profundidad de las regiones disgregadas del producto de seda se puede ajustar pues, p.ej., según la duración de la exposición de dicha superficie al disolvente de seda. Los productos de seda de acuerdo con la presente invención tienen por lo tanto regiones en las que se lleva a cabo la disgregación y regiones en las que no ha tenido lugar la disgregación. Dichas regiones suelen quedar claramente separadas en el producto final (es decir después del restablecimiento) por una pequeña región de frontera (véase también los ejemplos en los que estas regiones de frontera son visibles). Si bien los productos de acuerdo con la presente invención presentan normalmente al menos una superficie con disgregación completa (con una cierta profundidad de regiones de disgregación), también están presentes regiones no disgregadas (normalmente, en el lado opuesto de la superficie que ha sido expuesta a la solución de disgregación (es decir el disolvente de seda)).

Preferentemente, la profundidad de la disgregación (visible en el producto final como la profundidad a la que se ha restablecido la fibroína (y cristalizada) y que aparece como una densa masa (a diferencia de las fibras de fibroína aún visibles en la porción del producto de seda que no se ha disgregado; es decir la fase de fibroína homogénea o

- continua) es 5 μm o más con el fin de proporcionar un producto de seda que presenta unas mejores características mecánicas y morfológicas según la presente invención, p.ej., una estabilidad flexible y/o una superficie cerrada. El producto con una profundidad de disgregación, p.ej., de aproximadamente 1 μm o menos podría presentar grietas o propiedades mecánicas menos robustas. Dependiendo del uso previsto para los productos de seda de acuerdo con la invención, la profundidad de disgregación es preferentemente 20 μm o más, más preferentemente 50 μm o más, especialmente 100 μm o más. En realizaciones específicamente preferentes de la presente invención, el producto de seda tiene una profundidad de disgregación de al menos 10 % del espesor total del producto de seda, lo que se significa que al menos un 10 % del espesor total del producto de seda está disgregado (desde la superficie expuesta hacia dentro del producto de seda). Productos más preferentes aún presentan una profundidad de disgregación de al menos 20 %, especialmente al menos 30 %. La "profundidad de disgregación" es visible en el producto final en la sección transversal como la distancia entre la superficie y el extremo de las regiones restablecidas (y cristalizadas) del producto. El "extremo de las regiones restablecidas" también es el comienzo de la región en la que no ha tenido lugar la disgregación y en la que están presentes las fibras de seda en su forma original y que pueden distinguir claramente unas de otras. La "profundidad de disgregación" es prácticamente el diámetro de la fase de fibroína homogénea (sin cavidades de atrapamiento o menos de un 5 % v/v de las mismas) en el producto final; el resto es prácticamente la fase de fibroína filamentosa del producto final. En la frontera entre la fase continua y la filamentosa, están presentes fase y regiones mixtas, dependiendo de las condiciones de reacción que se apliquen y del espesor y naturaleza del material de partida. Dichas regiones mitas tienen normalmente más de un 5 % v/v de cavidades y las fibras de seda al menos parcialmente aplicadas entre sí, si bien, normalmente con estructuras no disgregadas.
- Asimismo, los productos de seda bidimensionales que se pueden obtener a través del procedimiento de la presente invención tienen nuevas y ventajosas propiedades, especialmente propiedades mecánicas y morfológicas. Específicamente, es preferente un producto bidimensional en forma de lámina, preferentemente para uso médico, especialmente una película, una membrana, una lámina tejida o una malla para la fijación, propagación, crecimiento y diferenciación de células.
- Por otra parte, el procedimiento de acuerdo con la presente invención se puede utilizar para producir un material de cultivo celular, p.ej., un sustrato de células (para cultivar células) en el que se puede sembrar células para su posterior crecimiento o producción de componentes celulares (p. ej., proteínas recombinantes u otras sustancias que se secretan a partir de células).
- La presente invención quedará mejor ilustrada mediante los siguientes ejemplos y dibujos, sin quedar limitada por ello no obstante.
- La Fig. 1 muestra un diseño de trenzado (imagen de la izquierda) y la micrografía electrónica de barrido (imagen de la derecha) de la estructura tubular trenzada.
- La Fig. 2 presenta micrografías de los conductos nerviosos guía de fibroína de seda (SF-NGC), A) Micrografías MEB de vistas transversales de SF-NGC (Aumento 23x); B) sección aumentada de la imagen A (Aumento 200x); C) Vista lateral de SF-NGC (Aumento 50x); D) micrografía fluorescente de células SC en la superficie interior de la pared de SF-NGC.
- La Fig. 3 presenta los resultados de una prueba de compresión con un sistema de pruebas adaptado para verificar la mejor elasticidad tras la modificación de las estructuras tubulares desgomadas. Se sometieron a prueba cuatro tratamientos diferentes del andamio en bruto inicial: incubación solamente con metanol (MeOH); posterior incubación con ácido fórmico y metanol (AF - MeOH); incubación posterior con $\text{CaCl}_2/\text{H}_2\text{O}/\text{etanol}$ y metanol ($\text{CaCl}_2/\text{H}_2\text{O}/\text{EtOH}$ - MeOH); incubación posterior con $\text{CaCl}_2/\text{H}_2\text{O}/\text{etanol}$, ácido fórmico y metanol ($\text{CaCl}_2/\text{H}_2\text{O}/\text{EtOH}$ - AF - MeOH).
- La Fig. 4 presenta la determinación de la citotoxicidad por ensayo MTT. Se cultivaron fibroblastos NIH/3T3 en medio de lixiviación de material del andamio en bruto no procesado y los SF-NGC preparados respectivamente. Se utilizó el medio de cultivo normal como grupo de control. Todos los datos son medias de 8 experimentos independientes \pm SEM.
- La Fig. 5 presenta los resultados de la prueba de permeabilidad celular a través de un ensayo de desplazamiento en el que se utiliza un coágulo de fibrina que contiene fibroblastos de NIH/3T3 y un segundo coágulo cargado con PDGF-AA como quimiotáctico. Los fibroblastos pasaron a través de diferentes espaciadores, incluyendo una malla de tamiz de 100 μm de tamaño de poro (control positivo, fila 1) y la estructura de seda tubular sin procesar (fila 2), pero no a través de SF-NGC utilizado. Las columnas A, B y C representan la vista desde la célula inicial que contiene coágulo de fibrina, el lado opuesto del espaciador utilizado y el coágulo de fibrina inicial que contiene PDGF-AA, respectivamente. Se tiñeron todas las muestras para determinar las células residuales o invadidas por teñido AM con calceína.
- La Fig. 6 presenta A) un conducto nervioso guía de fibroína de seda (SF-NGC) implantado *in vivo* en un modelo de rata con lesión del nervio ciático. B) Lado proximal del SF-NGC según se observa 1 semana después del implante. La flecha negra indica una capa delgada de tejido fibroso recién formada que remata el extremo de SF-NGC. C) Área de la cirugía del nervio periférico según se observa 1 semana después del implante que presenta pequeños vasos sanguíneos en la capa delgada dl tejido fibroso. D). Vista en aumento del rectángulo negro de C.

La Fig. 7 presenta un ejemplo de crecimiento de axón a través de un SF-NGC, 12 semanas después del implante. Se tiñeron los axones por Inmunotinción de neurofilamento de 200 kDA. El asterisco y la flecha indican una red densa y dispersa de axones regenerados, respectivamente.

5 La Fig. 8 presenta análisis cuantitativos de la recuperación funcional locomotora 12 semanas después del implante en animales, que incluyen el área de la huella, la intensidad ejercida en área de máximo contacto con el suelo, duración de la posición y el ciclo de trabajo de la extremidad trasera derecha operada. La intensidad de la extremidad trasera derecha se expresó como un porcentaje de la extremidad trasera izquierda contralateral. Los datos son la media de 6 animales \pm ET

10 La Fig. 9 presenta la escala de valoración locomotora BBB para todos los animales trasplantados con SF-NGC, SF-NGC cargado con colágeno e injerto autólogo. Todos los datos son las medias de 6 animales \pm ET.

La Fig. 10 muestra A) medidas electrofisiológicas de la amplitud de acción potencial máxima (PAPA), B) área de acción potencial del nervio compuesto (CNAP) y C) velocidad de conducción nerviosa (NCV). Todos los parámetros fueron determinados con una estimulación supramáxima. Todos los datos son la media de 6 animales \pm ET. *Indica una diferencia significativa de $p < 0,05$.

15 La Fig. 11 presenta imágenes de productos de seda tridimensionales de acuerdo con la presente invención que fueron sometidos a un período de tratamiento de 10 o 20 segundos con $\text{CaCl}_2/\text{EtOH}/\text{H}_2\text{O}$, seguido de 10 o 20 segundos de tratamiento con ácido fórmico tal como se ha descrito. Las Fig. 11A y 11C presentan el producto de fibroína de seda sin tratar; la Fig. 11B y 11D presenta el producto tras el tratamiento durante 20 segundos con $\text{CaCl}_2/\text{EtOH}/\text{H}_2\text{O}$, seguido de 20 segundos de tratamiento con ácido fórmico. La Fig. 11E-11G presenta las mediciones de la profundidad de la disgregación (seguido de restablecimiento) durante 20 segundos de tratamiento (55,902, 73,397 y 73,662 μm); Las Fig. 11H y 11I presentan mediciones de la profundidad de disgregación (seguido del restablecimiento) para el tratamiento de 10 segundos (17,804 y 27,57 μm).

25 La Fig. 12 muestra IZQUIERDA: imágenes de microscopia electrónica de barrido (MEB) de las matrices de seda trenzadas sin tratamiento que sirven como control. CENTRO imágenes MEB que presentan superficie de los productos de seda que fueron sometidos a un tratamiento de $\text{CaCl}_2/\text{EtOH}/\text{H}_2\text{O}$ (20 s CaCl_2) o ácido fórmico (20 s AF) durante un período de tratamiento de 20 s o 40 s (40 s CaCl_2 ; 40 s AF). DERECHA: imágenes de MEB que presentan superficies de productos de seda de acuerdo con la presente invención que fueron sometidos a tratamiento de $\text{CaCl}_2/\text{EtOH}/\text{H}_2\text{O}$ y ácido fórmico, cada una de las etapas durante un período de tratamiento de 20 s (20 s $\text{CaCl}_2/20$ s AF). Las barras a escala son 100 μm y 10 μm , respectivamente.

30 La Fig. 13 presenta la soldadura de fibras de seda nativa y desgomadas para obtener estructuras no interrumpidas e interrumpidas (13A (patente estadounidense US 8 202 379 B1), 13B (Haverhals y col., 2010), 13C (Ghanaati y col., 2010).

Ejemplos:

Materiales y Procedimientos

35 A no ser que se señale de otra forma, todos los reactivos se obtuvieron de Sigma (Viena, Austria) y de calidad analítica.

Diseño y preparación de conductos de seda

40 Se compraron fibras blancas de gusano de seda *Bombyx mori* en bruto de 20/22den, 250T/m, de Testex AG (Zürich, Suiza). El conducto de seda tenía un diseño tubular y había sido fabricado en cooperación con una empresa de trenzado (Edelrid GmbH, Isny im Allgäu, Alemania). Seis fibras de seda simples forman un hilo retorcido, que representa la materia prima de las máquinas de trenzado comerciales. Se diseñó la estructura tubular a partir de seis hilos retorcidos entrelazados; ilustrados en la Figura 1. Se desgomó el conducto de seda cruda en ebullición en 0,2 M de ácido bórico en un tampón borato 0,05 M a pH = 9.0 (Jiang y col., Mat. Lett. 60 (2006), 919-925). Por tanto, se hirvieron 2 g de conductos de seda dos veces en 500 ml de solución de desgomado durante 45 minutos. Después del desgomado, se lavaron a fondo las matrices en ddH_2O y se secaron al aire antes de seguir un posterior tratamiento.

50 Se colocaron los tubos de SF desgomada en una varilla de ABS (acrilonitrilo butadieno estireno) y se sumergieron en una solución en ebullición del disolvente ternario cloruro de calcio/agua destilada/etanol ($\text{CaCl}_2/\text{H}_2\text{O}/\text{etanol}$) en una relación molar de 1:8:2 durante 20 segundos. Inmediatamente después del grabado de la superficie exterior, se sumergieron los tubos en 100% of ácido fórmico (AF) a temperatura ambiente durante 20 segundos. Se sumergieron los tubos en metanol durante 20 minutos y a continuación, se lavaron a fondo con ddH_2O . Se secaron los tubos bajo un flujo de aire laminar y se esterilizaron por autoclaveado antes de su uso.

Pruebas de resistencia y fatiga

Para someter a prueba la elasticidad de SF-NGC en comparación con el andamio de SF tubular inicial sin procesar, se adaptó una máquina para pruebas de compresión. Se diseñó dicho dispositivo para comprimir de forma repetida una muestra de ensayo con una presión máxima constante. Partiendo de la posición alta, se desplaza el pistón hacia abajo con un servo motor (Modelcraft RS2 mG/BB standard servo, Conrad Electronic SE, Hirschau, Alemania) a una velocidad de aproximadamente 5 mm/s de manera lineal hasta que toca la sonda. El pistón tensa continuamente la sonda hasta que se alcanza un umbral de fuerza predefinido. Un resistor sensible a la fuerza (extensómetro FSR 151, Interlink electronics, Camarillo, CA, Estados Unidos), que está integrado en el pistón, funciona como un sensor y forma parte de un divisor de tensión. Se muestrea constantemente la resistencia y, por tanto, la fuerza aplicada, a una frecuencia de muestreo de 50 Hz utilizando el ADC de 10 bit incorporado del microcontrolador (Arduino Duemilanove Controller Board with Atmega 328 μ C, Atmel Munich GmbH, Garching/Munich, Alemania). Se calibra el sistema utilizando una escala de laboratorio y que funciona con ± 5 g de precisión. Una vez alcanzado el umbral, se retorna el pistón a la posición alta, en la que permanece durante el periodo que ajuste el usuario. Este proceso se repite para el número de interacciones que ajuste el usuario a través de una pantalla LCD en serie (SerLCD SFE 09395 2 line LCD Display, Sparkfun electronics, Boulder, Estados Unidos).

Antes de la prueba, se hidrataron las correspondientes muestras en PBS durante toda la noche. Para la prueba, se fijaron los conductos en una placa Petri y se cubrieron con PBS. El régimen de la prueba mecánica consistió en 1.000 ciclos de compresión y liberación con 300 g de carga y una duración de la compresión de 300 ms por compresión. Una vez realizado el procedimiento de la prueba, se secaron al aire los tubos probados durante toda la noche a temperatura ambiente y se cortaron cuidadosamente a 1 mm de espesor en el sitio de impresión para el análisis morfológico. Finalmente, se evaluó la deformabilidad que permaneció tras las compresiones por análisis MEB.

Análisis MEB

Se fijaron muestras en 2,5 % de glutaraldehído en tampón cacodilato durante toda la noche a temperatura ambiente. A continuación, se deshidrataron las muestras a través de etanoles graduados seguidos de hexametildisilazano, y se dejaron secar al aire en una campana de humos. Se metalizaron las muestras por bombardeo atómico con Pd-Au utilizando un metalizador Polaron SC7620 (Quorum Technologies Ltd. East Grinstead, Reino Unido) y se examinó utilizando un microscopio electrónico de barrido JEOL JSM-6510 (JEOL GmbH, Eching/Munich, Alemania) a 3 kV.

Experimentos de cultivo celular

30 NIH/3T3

Se compró la línea celular NIH/3T3 de ECACC (Colección Europea de cultivos celulares, Reino Unido). Se cultivaron células NIH/3T3 en DMEM que contenía 10 % de suero de becerro fetal (FCS) (Lonza Ltd., Basilea, Suiza) suplementado con 2 mM L-glutamina, 100 U/ml penicilina y 0,1 mg/ml de estreptomina en placas revestidas con 0,2 % de solución de gelatina.

35 Células de tipo Schwann

Se aislaron las células estromales derivadas de tejido adiposo (ASC) de ratas Sprague-Dawley y se diferenciaron para el fenotipo de células de tipo Schwann (Kingham y col., Exp. Neurol. 207 (2007), 267-274). Brevemente, se troceó grasa de las vísceras diseccionada y se trató con colagenasa tipo I para aislar ASC. Después del cultivo y de pasar las células en el medio de crecimiento, medio de Eagle modificado (α -MEM) que contenía 10 % de suero de becerro fetal (FCS; PAA, Pasching, Austria), se incubaron primero las ASC con medio de crecimiento que contenía 1 mM de β -mercapto-etanol durante 24 h. A continuación, se reemplazó el medio nuevo suplementado con 35 ng/ml de ácido retinoico *trans*- en su totalidad durante 72 h. Finalmente, se añadieron el medio de diferenciación que contenía factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDF; Peprotech, Viena, Austria), 10 ng/ml de factor de crecimiento de fibroblasto básico (bFGF; Peprotech, Viena, Austria), 14 μ M forskolina y 252 ng/ml de factor 2 de (GGF-2; Peprotech, Viena, Austria).

Se sembraron células de tipo Schwann (SLC) en la pared interior del SF-NGC en una concentración de 10^5 células/ml. Al cabo de dos horas, se suministró a las células un medio de cultivo que contenía 10% FCS (PAA, Pasching, Austria), 0,1% de heregulina (Peprotech, Viena, Austria) y 14 mM forskolina. Se evaluó la fijación de SLC a la estructura de la pared interior de SF-NGC al cabo de tres días con tinción con calceína AM.

50 Permeabilidad celular

Se diseñó un ensayo de desplazamiento celular para verificar la impermeabilidad celular de SF-NGC. Se utilizó coágulo de fibrina de 100 μ l (Tisseel, Baxter, Viena, Austria) que contenía PDGF-AA (Peprotech, Viena, Austria) para inducir el desplazamiento celular. Se mezclaron 10 ng de pDGF-AA a fondo con fibrinógeno antes de la inducción de la polimerización con 250 unidades/ml de trombina. La estructura hermética de la fibrina resultante impide la liberación explosiva de PDGF-AA. A continuación, se colocó el coágulo de fibrina dentro de los tubos investigados y se fijaron con pasador las construcciones así ensambladas en placas de 12 pocillos revestidas con

silicona (Sylgard® 184, Dow Corning Europe S.A., Seneffe, Bélgica). Se colocó un segundo coágulo de fibrina de 100 µl que contenía $2,5 \times 10^5$ de fibroblastos NIH/3T3 sobre la parte superior del tubo. Se polimerizó fibrinógeno con 2 unidades/ml de trombina para crear una estructura de fibrina homogénea y suelta y dejar que los fibroblastos se deslizaran desde el coágulo hacia el estímulo quimiotáctico. Como control positivo, se separó el coágulo de fibrina del coágulo que contenía PDGF-AA utilizando una malla de nilón de un tamiz celular con un tamaño de poro de 100 µm (Becton Dickinson, Schwechat, Austria). Se añadió el medio hasta que quedaron completamente cubiertas las construcciones y se cambiaron en los días 2 y 4 tras ensambalar los ensayos. En el día 6, se evaluó el desplazamiento celular tiñendo el coágulo de fibrina que contiene PDGFAA con calceína AM (Invitrogen, Viena, Austria). Además de la posibilidad de fijar las construcciones en una placa Petri, se sabe que Sylgard® 184 no favorece la adhesión celular como resultado de su carácter hidrófobo (Ai y col., Cell Biochem Biophys. 38 (2003), 103-114) y por lo tanto impide la posibilidad de que se desplacen las células desde un coágulo al otro a lo largo de la superficie de la placa de cultivo celular. En consecuencia, la única manera de desplazarse de un coágulo a otro es pasar a través del SF-NGC y por tanto es posible que se requiriera cierta permeabilidad celular de SF-NGC.

Ensayo de citotoxicidad

Para someter a prueba la citotoxicidad del SF-NGC preparado, se sumergió 1 g del material de SF-NGC diseccionado en 5 ml de medio de cultivo celular durante al menos 24 h. En paralelo, se sembraron $0,2 \times 10^5$ fibroblastos NIH/3T3 por pocillo en placas de 24 pocillos. A continuación, se filtró el medio que contenía los productos de lixiviación del material diseccionado (0,22 µm, Rotilabo, Karlsruhe, Alemania) y se utilizaron para cambiar el medio en los cultivos celulares. Se utilizó el medio de cultivo patrón como control negativo. Se aspiró el medio de cultivo celular y se añadió el correspondiente medio de cultivo celular que contenía 650 mg/ml MTT bromuro de [3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio a cada pocillo. Al cabo de 1 hora de incubación a 37 °C y 5 % CO₂, se aspiró el medio y se disolvió el precipitado de MTT formazan en DMSO por agitación mecánica en la oscuridad durante 20 minutos. Se transfirieron partes alícuotas de 100 µl de cada muestra a placas de 96 pocillos. Se hizo la lectura de la absorbancia a 540 nm inmediatamente sobre un lector de microplaca automático (Spectra Thermo, TECAN Austria GmbH, Austria). Se recogieron los valores de la densidad óptica (DO) para un fondo inespecífico.

Animales y modelo de defecto nervioso de 10 mm

Se alojó a todos los animales en las instalaciones del Instituto Ludwig Boltzmann para traumatología clínica y experimental en un entorno para controlar la temperatura. Se administró a los animales comida y agua *ad libitum*. Todos los protocolos experimentales fueron aprobados por el gobierno municipal de Viena, Austria, de acuerdo con la Guía para el Cuidado y uso de animales de laboratorio tal como lo define el Instituto Nacional de Salud.

Se utilizó en los experimentos un total de 22 ratas Sprague-Dawley hembra (Animal Research Laboratories, Himberg, Austria), con un peso comprendido entre 350 - 450 g. Se asignó 18 animales a cada uno de los tres grupos de tratamiento: injerto autólogo (n = 6), SF-NGC (n = 6) SF-NGC con carga de colágeno (n = 6) durante 12 semanas de observación. Se pesó a los animales y se los anestesió en una caja de humo con 3,5 % de isoflurano (Forane®, Abbott, Viena, Austria) a una velocidad de flujo de 800 ml/min. A continuación, se mantuvo la anestesia a lo largo de todo el procedimiento quirúrgico utilizando 2,5 % de isoflurano a través de una pieza nasal. Al nivel de mitad del muslo derecho, se afeitó el área quirúrgica y se limpió con β-Isodona (Mundipharma, Viena, Austria). Se llevaron a cabo los siguientes procedimientos quirúrgicos con un microscopio operativo (Leica M651, Leica GmbH, Viena, Austria). Se expuso el nervio ciático por incisión de la piel y el músculo. Se extirpó un segmento de 8 mm del nervio ciático dando como resultado un hueco de 10 mm tras una ligera retracción de los muñones distal y proximal. En el grupo de injerto autólogo, se extirpó un segmento de 8 mm del nervio ciático, invertido 180 ° y después se suturaron de nuevo los muñones proximal y distal utilizando Ethilon 8/0 (Ethicon-Johnson & Johnson, Bruselas, Bélgica) a través del epineurio. En ambos grupos SF-NGC, se implantó el conducto por inserción de los muñones del nervio proximal y distal en el tubo de 12 mm y se coaptaron con el andamio mediante dos suturas epineurales. En uno de los grupos se rellenó el espacio interior de los SF-NGC adicionalmente con colágeno tipo I de origen de cola de rata (Millipore, Viena, Austria). A continuación, se suturaron las capas del músculo con una sutura de recorrido continuo (Vicryl 4/0, Ethicon-Johnson & Johnson, Bruselas, Bélgica) y se cerró la piel con un punto reabsorbible (Vicryl 4/0, Ethicon-Johnson & Johnson, Bruselas, Bélgica). A continuación, se volvió a colocar a los animales en sus jaulas para que se recuperaran. Inmediatamente se administró un tratamiento analgésico de 0,75 mg/kg BW Meloxicam (Metacam®, Boehringer Ingelheim, Ingelheim/Rhein, Alemania) y 1,25 mg/kg BW butorfanol (Butamidol®, Richter Pharma AG, Wels, Austria) inmediatamente antes del procedimiento quirúrgico y durante dos días después.

Para obtener la información inicial sobre el comportamiento de los SF-NGC y las reacciones de los tejidos de alrededor *in vivo*, se llevó a cabo un estudio con puntos temporales de corta implantación de 1 y 3 semanas (2 animales/punto temporal) de acuerdo con el procedimiento quirúrgico descrito anteriormente.

Muestreo del tejido, perfusión e inmunohistoquímica

Respectivamente, al cabo de 1, 3 o 12 semanas tras la cirugía, se anestesió profundamente a los animales por inhalación de 3,5 % de isoflurano y se los sometió a eutanasia con 110 mg/kg BW hidrocloreuro de ketamina (Ketasol®; Dr. E. Graeb AG, Berna, Suiza) y 12 mg/kg BW xilazina (Rompun® 2%, Bayer AG, Viena, Austria) por

vía intraperitoneal. A través de la aorta ascendente, se perfundió a los animales con 4 % de paraformaldehído en 0,1 M de tampón fosfato a pH 7,4. A continuación, se recogieron el trasplante autólogo o el SF-NGC implantado con un microscopio operativo junto con el muñón del nervio proximal y distal.

5 Para indicar la regeneración del axón a través de tinción de inmunohistoquímica se utilizó un anticuerpo primario de ratón: anti-neurofilamento 200kD (Abcam Ltd., Cambridge, RU) (Huang y col., *Biomat.* 33 (2011), 59-71; Huang y col., *Eur. J. Neurosci.* 23 (2006), 273-278).

Pruebas conductuales – Análisis del paso (CATWALK™)

10 Para verificar el progreso de recuperación funcional de los animales de ensayo, se utilizó el sistema de análisis de la huella Catwalk (Noldus, Wageningen, Países Bajos). Este procedimiento permite una cuantificación objetiva de varios parámetros del paso dinámico y estático (Deumens y col., *J. Neurosci. Meth.* 163 (2007), 120-130; Bozkurt y col., *J. Neurosci. Meth.* 173 (2008), 91-98). Se llevó a cabo el entrenamiento previo con los animales durante 3 semanas antes de la cirugía. Realizado el procedimiento, se sometió a ensayo los animales una vez a la semana y hasta 12 semanas para todos los grupos. Durante cada ciclo, una videocámara colocada bajo una placa de vidrio captura las huellas reales. Con este análisis, es posible detectar las diferencias entre las posiciones, la dinámica y la presión de cada huella. Se determinaron varios parámetros para la recuperación funcional locomotora incluyendo el área de la huella, el área de contacto total de la pata durante el paso, la intensidad máxima, la presión ejercida en el momento de máximo contacto con el suelo de vidrio de la pata, la duración de la postura, el tiempo de contacto de la pata con el suelo de vidrio y el ciclo de trabajo, la división de la duración de la postura y la suma de la duración de la postura más el tiempo que la pata no estuvo en contacto con el suelo de vidrio. La intensidad de la pata trasera derecha se expresó como porcentaje de la pata trasera izquierda contralateral. El experimento Catwalk se llevó a cabo en modo oculto.

Prueba BBB

25 La prueba Basso, Beattie y Bresnahan (BBB) estaba diseñada originalmente para evaluar la recuperación funcional locomotora tras lesiones de contusión en la médula espinal de ratas. Las puntuaciones oscilan entre la parálisis completa (0) hasta locomoción normal (21). En este caso, se utilizó la puntuación BBB como parámetro de evaluación de la recuperación del nervio periférico, según la descripción anterior (Schmidhammer y col., *Acta Neurochir.* 100 (2007), Supplement 161-167) y fue llevado a cabo por tres revisores con experiencia "oculto" en cuanto a las identidades de los animales.

Electrofisiología e histología

30 Al cabo de 12 semanas de la implantación, se llevó a cabo el análisis electrofisiológico (NeuroMax; XLTEK, Oakville, Ontario, Canadá) tal como se ha descrito anteriormente (Schmidhammer y col., *J. Trauma* 56 (2004), 571-584) e incluyó la amplitud de acción potencial máxima, el área de acción potencial de compuesto (CNAP) y la velocidad de conducción del nervio.

Análisis estadístico

35 Se llevó a cabo el análisis estadístico con el software estadístico Graph Pad Prism (Graph Pad Software Inc., San Diego, CA, Estados Unidos). Se examinó la distribución normal de los datos con la prueba de Kolmogorov-Smirnov. Se analizaron los datos de recuperación obtenidos a través del análisis del paso según Catwalk y la puntuación BBB, MTT y los datos electrofisiológicos con ANOVA una dirección. Todos los gráficos de este estudio se muestran como la media \pm desviación típica (DT).

40 Resultados

Preparación y topografía de conductos de seda

45 Tal como se representan en la Figura 1, SF-NGC en bruto consiste en un diseño trenzado compuesto de fibras de seda simples. Después de desgomar la superficie, se gravó SF-NGC con CaCl₂/ H₂O/etanol y AF durante 20 segundos cada uno, fijando su estructura con metanol. Topográficamente, estos tratamientos tuvieron como resultado una fusión de las fibras de seda simples exteriores a una capa próxima con un espesor comprendido entre aproximadamente 25 y 75 μ m (Fig. 2A, B). A diferencia de la capa exterior, en la que las fibras de seda simple parecen fundirse y forman una capa lisa (Fig. 2C), el lado de la pared enfrentado al espacio interior sigue representando la estructura trenzada de las fibras de seda simples. La figura 2D presenta estas fibras de seda simples interiores como un buen sustrato para células SC y causan un alineamiento celular directo gracias a su diseño trenzado.

Prueba de resistencia

50 Para verificar la elasticidad necesaria de SFNGC para soportar la presión externa del tejido de alrededor que podría suponer negativamente un derrumbamiento de la estructura tubular, se realizaron pruebas de resistencia mecánica con un sistema adaptado. Se comprimieron las matrices durante 1.000 ciclos con 300 g por compresión y una

duración de la presión de 300ms. En todos los tratamientos, se incubaron SF-NGCs con metanol en una etapa final para fijar la estructura modificada de las matrices. Los SF-NGCs sin procesar o tratados con AF presentaron un grave derrumbamiento tras la carga mecánica (Fig. 3). El tratamiento con $\text{CaCl}_2/\text{H}_2\text{O}$ /etanol mejoró la resistencia mecánica de SF-NGC con el resultado de la preservación de parte de su espacio interior, pero siguió presente una sustancial deformación. Ninguno de estos tres tratamientos pudo proporcionar propiedades elásticas a los SF-NGC para soportar la presión. Sin embargo los SF-NGC tratados con $\text{CaCl}_2/\text{H}_2\text{O}$ /etanol seguido de AF pudieron retener su forma redonda después de la prueba.

Ensayo de citotoxicidad

Se empleó el ensayo MTT para investigar el contenido de posibles residuos citotóxicos derivados del proceso de preparación en los SF-NGC generados. Se lixivió el material diseccionado desde SF-NGC y el andamio de seda cruda sin procesar con el medio celular. Se utilizaron estos medios lixiviados como medio de cultivo durante 24 horas. De acuerdo con los resultados del ensayo MTT (Fig. 4), no se pudo detectar ninguna diferencia significativa en la viabilidad celular de fibroblastos NIH/3T3 entre el medio de cultivo celular patrón sin tratar, el medio lixiviado del andamio cruda o el material SF-NGC lo que indica la ausencia de citotoxicidad de SF-NGC preparado.

Permeabilidad celular

Se diseñó un ensayo de desplazamiento celular para verificar la impermeabilidad celular de SF-NGC, en función de las propiedades quimiotácticas de PDGF-AA sobre los fibroblastos para inducir la migración celular desde un coágulo de fibrina portador de célula y otro coágulo de fibrina que contiene PDGF-AA. Para invadir el coágulo de fibrina que contiene PDGF-AA, los fibroblastos de NIH/3T3 tienen que pasar a través de un tamiz celular con $100\ \mu\text{m}$ de tamaño de poro (grupo de control positivo), un andamio de seda tubular cruda sin procesar o un SF-NGC. Se observó un significativo desplazamiento de fibroblastos por estimulación con PDGF-AA durante 5 días a través de la malla de un tamiz celular (Fig. 5, Fila 1) y el andamio cruda (Fig. 5, Fila 2), pero no a través de SF-NGC (Fig. 5, Fila 3).

Resultados *in vivo* preliminares

Se llevaron a cabo estudios *in vivo* preliminares para evaluar la biocompatibilidad con el tejido del SF-NGC implantado. En la figura 6A se muestran los muñones proximal y distal coaptados con el SF-NGC con dos suturas epineurales. Al cabo de 1 semana de la implantación, la inspección a simple vista reveló que SF-NGC no presentó una degradación sustancial (Fig. 6B). Asimismo, no se detectó ningún signo de reacciones inflamatorias o formación de neuroma en los sitios de coaptación. Toda la superficie del injerto implantado se cubrió de una fina capa de tejido fibroso. Cabe destacar que el extremo proximal y el distal de SF-NGC trasplantado fue rematado con tejido fibroso, llevando a nivel microscópico a una interfaz entre el material de andamio y los muñones del nervio (Fig. 6B). Por otra parte, esta fina capa de tejido fibroso presentó pequeños vasos sanguíneos (Fig. 5C, D).

Regeneración de axón

Estos resultados demostraron que un pequeño hueco de 8 mm en el nervio ciático de la rata pudo salvarse con el implante de SF-NGC en el sitio del defecto. Al revelarse empleando tinción 200 de neurofilamento, la Fig. 5 muestra la distribución de axones regenerados a través del espacio interior de SF-NGC implantado. Desde el extremo proximal al distal, es claramente visible un proceso de regeneración de axones (fig. 5 indicado por *), que disminuye tras aproximadamente 6,5 mm. A pesar de esta disminución de la densidad del axón, se puede observar un manojo de axones regenerados que alcanzan el muñón distal 12 semanas después de la implantación. La carga del espacio interior con colágeno no afectó a la regeneración del axón.

Recuperación funcional - Catwalk

A las 12 semanas del implante, el área media de la huella de las patas traseras derechas operadas era comparable entre el grupo de control autólogo y el grupo SF-NGC cargado con colágeno. El área media de la huella del grupo SF-NGC sin colágeno, sin embargo, fue más bajo que el del grupo de control autógeno y los grupos SF-NGC cargados con colágeno, pero no significativamente diferente. La intensidad media ejercida por las patas traseras derechas presentó un resultado similar entre ambos grupos SF-NGC, pero no se redujeron significativamente en comparación con el control autólogo. La duración de la posición media de las patas traseras derechas indicó una mejora de la recuperación funcional cuando se cargó con colágeno SF-NGC en comparación con SF-NGC puro, pero no fue estadísticamente significativo. De manera similar a la intensidad media, el ciclo de trabajo medio de las patas traseras derechas no fue diferente entre el grupo SF-NGC cargado con colágeno y el grupo SF-NGC, pero los correspondientes valores medios fueron más bajos que en el control autólogo.

Tabla 1. Análisis cuantitativos de la recuperación funcional locomotora 12 semanas después del implante en animales que incluyeron el área de las huellas, la intensidad ejercida en el área de máximo contacto con el suelo, duración de la posición y ciclo de trabajo de la pata trasera derecha operada. La intensidad de la pata trasera derecha se expresó como el porcentaje de la pata trasera izquierda contralateral. Todos los datos son medias de 6 animales \pm ET.

	Autólogo	SF-NGC	SF-NGC Col
Área de la huella de la pata trasera derecha	25,5 \pm 9,9	19,0 \pm 12,2	24,1 \pm 11,6
Intensidad ejercida por la pata trasera derecha	57,6 \pm 13,7	54,6 \pm 20,5	54,2 \pm 12,4
Duración de la posición	57,5 \pm 14,0	45,1 \pm 17,2	52,1 \pm 11,0
Ciclo de trabajo	59,8 \pm 14,5	51,7 \pm 9,5	51,7 \pm 11,7

Escala de recuperación BBB

Se determinaron las puntuaciones BBB 4, 6, 8, 10 y 12 semanas después del implante. En la Fig. 8 se ilustra la recuperación de la función nerviosa a partir de la semana 4 a la semana 12 después de la intervención quirúrgica. En la primera evaluación postoperatoria (4 semanas), se produjo el despeje de la puntera en el avance de la extremidad de los animales trasplantados con SF-NGC con colágeno o sin colágeno con más frecuencia que los animales tratados con injertos autólogos. A las 8 semanas del implante, la puntuación BBB media para el grupo SF-NGC solamente fue significativamente más alto que el autólogo, así como los grupos SF-NGC cargado con colágeno. En el último punto temporal de evaluación postoperatorio (12 semanas), los animales con injertos autólogos presentaron una puntuación BBB más baja que los animales trasplantados con SF-NGC, con y sin colágeno. A las 12 semanas, no se pudo detectar ninguna mejora de la puntuación BBB para los animales que recibieron construcciones SF-NGC como resultado de la carga tubular con colágeno,

Electrofisiología

Se llevaron a cabo estudios electrofisiológicos 12 después del implante en los que se determinaron tres parámetros diferentes: la amplitud de acción potencial máxima (PAPA), área de acción potencial del nervio compuesto (CNAP) y velocidad de conducción nerviosa (NVC). En la Tabla 2 se resumen los resultados, que se ilustran en la Fig. 9. No se pudieron determinar diferencias significativas para PAPA y CNAP entre SF-NGC, SF-NGC cargado con colágeno y el control autólogo. En contraposición, los valores NCV del grupo autólogo fueron significativamente más altos en comparación con los grupos SF-NGC tanto con colágeno como sin él.

Tabla 2. Medidas electrofisiológicas de la amplitud de acción potencial máxima, área de acción potencial del nervio compuesto y velocidad de conducción nerviosa. Todos los parámetros se determinaron a una estimulación supramáxima. Todos los datos son la media de 6 animales \pm ET.

	Autólogo	SF-NGC	SF-NGC Col
área de acción potencial del nervio compuesto [mV/mA]	25,7 \pm 8,8	32,0 \pm 19,1	23,8 \pm 20,8
amplitud de acción potencial máxima [mV x ms]	15,8 \pm 7,4	14,5 \pm 5,7	13,5 \pm 13,2
velocidad de conducción nerviosa [m/s]	39,0 \pm 16,3	24,3 \pm 11,3	20,0 \pm 6,0

Duración del tratamiento y profundidad de la disgregación

La profundidad de la disgregación se puede controlar fácilmente y manejar según el control de la duración del tratamiento. Se sometió un producto de seda tridimensional de acuerdo con la presente invención a una duración de tratamiento de 10 o 20 segundos de CaCl₂/EtOH/H₂O, seguido de 10 o 20 segundos de tratamiento con ácido fórmico tal como se ha descrito anteriormente. En la Fig. 11: Fig. 11A y 11C se muestra el producto de fibroína de seda sin tratar; en la Fig. 11B y 11D se muestra el producto tras el tratamiento durante 20 segundos con CaCl₂/EtOH/ H₂O, seguido de 20 de tratamiento con ácido fórmico. En las Fig. 11E-11G se muestran las medidas de la profundidad de disgregación (seguido de restablecimiento) para los tratamientos de 20 segundos (55,902, 73,397 y 73,662 μ m); Las Fig. 11H y 11I presentan las mediciones de la profundidad de disgregación (seguido de restablecimiento) para los tratamientos de 10 segundos (17,804 y 27,57 μ m).

Explicación

En el presente estudio, una estructura tubular trenzada de fibras de fibroína de seda (SF) sirvió como materia prima para la producción del conducto guía nervioso (NGC). A través de varios tratamientos químicos de la estructura de SF tubular obtenida por ingeniería textil, se generó un conducto que presentaba anisotropía topográfica y

propiedades mecánicas que favorece su uso como NGC.

La elasticidad y la resistencia al acodamiento de los tubos de SF se potenció gracias al tratamiento químico con un disolvente ternario de $\text{CaCl}_2/\text{H}_2\text{O}$ /etanol (1:2:8 relación molar), AF (como agente de restablecimiento de acuerdo con la presente invención) y metanol (Fig. 2). $\text{CaCl}_2/\text{H}_2\text{O}$ /etanol disuelve las fibras SF nativas, al mismo tiempo que metanol induce la cristalinidad formando láminas β . En este contexto, se describió AF para inducir una estructura ordenada/disposición molecular en el estado de solución que tuvo como resultado una conformación en lámina β tras la eliminación del AF disolvente. Se aprovechó esta propiedad única de AF para generar una capa exterior de tipo cristalino de la pared del conducto nervioso (Fig. 2). Asimismo, variando el tiempo de incubación con reactivos de preparación, se puede controlar el espesor de la capa cristalina exterior. Este procedimiento de preparación lleva a matrices de SF para varios enfoques de ingeniería de tejidos (TE) y medicina regenerativa, como pueden ser la potenciación de la vascularización o vendas para heridas.

Gracias al tratamiento con $\text{CaCl}_2/\text{H}_2\text{O}$ /etanol, aumentaron notablemente la elasticidad y la resistencia al acodamiento de SF-NGC. Al revelarse a través de pruebas de resistencia realizadas con un sistema de ensayos adaptado (Fig. 1) estas mejores propiedades mecánicas permiten que SF-NGC resista las fuerzas de compresión externas desde los tejidos que le rodean (Fig. 3).

Antes de la implantación, se llevaron a cabo ensayos de biocompatibilidad con SF-NGC preparados. Para los ensayos de toxicidad celular *in vitro*, se utilizó un ensayo MTT común (Fig. 4) con el que se indica que no se liberó ninguna sustancia desde el material que pudiera haber afectado a la viabilidad celular negativamente. Por otra parte, se evaluó el uso del lado interior del SF-NGC como sustrato celular para SLC (Fig. 2D). En general, las células de Schwann se consideran el factor más importante en la regeneración del nervio periférico gracias a su proliferación inicial a través del canal nervioso que permite que broten axones y se alarguen después. Por tanto, la idea dominante en ingeniería de tejidos del nervio periférico es someter a un ensayo posibles biomateriales de regeneración del nervio periférico con células Schwann o SLC. En los ejemplos de la presente invención, SLC diferenciadas de las células madre derivadas del tejido adiposo presentaron una buena capacidad de sembrado y fijación en el material de SF-NGC investigado comparable con poliestireno de cultivo tisular.

Asimismo, los ensayos *in vitro* incluyeron un análisis de la permeabilidad celular. Un ensayo de desplazamiento evaluó la infiltración celular desde la parte exterior en el espacio interior del SF-NGC. Se demostró que los fibroblastos eran capaces de atravesar la malla de un tamiz celular con un tamaño de poro de 100 μm , así como un andamio de seda sin procesar cruda, pero no SF-NGC, previsto para implante. Esto es un hallazgo crucial ya que *in vivo*, las células del tejido circundante, especialmente, fibroblastos, no deberían poder desplazarse al hueco entre los dos muñones del nervio. Las células invasoras podrían formar entonces un tejido fibroso que bloquearía estéricamente un nervio en crecimiento.

Cabe destacar que, aparte de su papel como agente de solvatación de SF y cristalización, AF se puede utilizar para modificar la vascularización *in vivo*. Se demostró que al variar el tiempo de tratamiento con AF, podía controlarse la vascularización *in vivo* de micro-redes no tejidas 3D a base de SF. En los estudios preliminares de la presente invención sobre la biocompatibilidad *in vivo* de SF-NGC, además de la ausencia de signos graves de inflamación, se documentó una capa fina de tejido fibroso que contenía pequeños vasos sanguíneos (Fig. 6C, D). Estas observaciones presentaron un crecimiento microvascular en SF-NGC, posiblemente impulsado por la liberación de factores de crecimiento desde el nervio regenerado y que sirven como suministro de nutrición para el nervio en regeneración. Este crecimiento microvascular en el SF-NGC podría estar influido por el tratamiento con AF durante la preparación. Otro interesante aspecto de la capa formada de tejido fibroso fue que remató los extremos del injerto formando una interfaz gradual entre los muñones del nervio y el SF-NGC implantado. Esta interfaz gradual podría prevenir el deslizamiento de SF-NGC implantado que podría haber provocado una lesión nerviosa posterior, incluyendo la formación de neuroma.

Las secciones longitudinales de los tejidos nerviosos regenerados, 12 semanas después del implante de SF-NGC, presentaron una completa superación de un defecto del nervio isquiático de 10 mm mediante axones regenerados (Fig. 7). Sin embargo, ha de señalarse que los axones en amasijo son mucho más densos en el primer 65 % del tamaño del defecto en su totalidad. La capacidad de regeneración de exones podría estar limitada y podría necesitar otros factores de estimulación del crecimiento nervioso, tales como factores neurotróficos, un andamio extracelular de carga de la cavidad o SLC.

Los ejemplos de la presente invención también demuestran la evaluación *in vitro* e *in vivo* de F-NGC presentado. Para los ensayos *in vivo*, se incluyó un grupo con colágeno localizado dentro del espacio interior de los conductos. El uso de cargas de la cavidad es de un interés emergente dentro del campo de los conductos nerviosos artificiales, especialmente de cara a huecos más grandes, denominados de tamaño crítico. Además de su valoración en la bibliografía por su papel favorecedor para la regeneración nerviosa, se ha observado también un efecto beneficioso del colágeno, en la regeneración del nervio periférico. Asimismo, el colágeno se considera un andamio vehículo para el suministro de factores de crecimiento y células a un emplazamiento de defecto nervioso. No obstante, en los ejemplos de la presente invención, no se observó ningún efecto beneficioso del colágeno como carga del espacio interior ni en los análisis histológicos ni en la recuperación de la función locomotora. Las mediciones electrofisiológicas indicaron incluso una significativa reducción de la velocidad de conducción del nervio en el grupo

SF-NGC cargado con colágeno en comparación con el grupo de control autólogo (Fig. 9C).

Los análisis del rastro del paso (Catwalk) para evaluar la recuperación funcional no reveló ninguna diferencia entre SF-NGC, SF-NGC cargado con colágeno y los controles autólogos 12 semanas después del implante. Los resultados del Catwalk coincidieron con un estudio reciente en el que se fabricaron los conductos a partir de seda de *Bombyx mori* pero contenían carga fibrosa de la cavidad de Spidrex®, otro biomaterial a base de seda.

Aparte de los análisis del rastro del paso, se evaluó la recuperación de la función locomotora a través del procedimiento de la escala BBB. Este procedimiento de escala fue utilizado originalmente para valorar la recuperación de la función y la locomoción en modelos de lesión de la médula espinal, pero también es adecuado para evaluar la recuperación funcional en modelos con defectos nerviosos. La puntuación BBB se consideró más sensible a la hora de detectar déficits residuales que el índice de la función del nervio ciático (SFI). En los ejemplos de la presente invención, la superación del defecto del nervio a través del injerto SF-NGC y SF-NGC cargado con colágeno condujo a una recuperación funcional significativamente superior en la escala locomotora BBB en comparación con el grupo de control autólogo.

Por otra parte, los parámetros de los productos de acuerdo con la presente invención, especialmente, la profundidad de disgregación (que se restablece entonces), se pueden controlar fácilmente y de forma reproducible. (Fig.11A-I).

Conclusión

La incidencia de lesiones nerviosas periféricas en heridas traumáticas abiertas de las extremidades es aproximadamente de un 5%. Por otra parte, la resección tumoral o malformación congénita podría también conducir a lesiones nerviosas. En consecuencia, estas incidencias suponen un enorme gasto en sanidad, bajas laborales prolongadas y una incapacidad crónica. Esto es prueba que es importante cuidar estas lesiones clínicamente de forma precisa, debido a su considerable alto impacto epidemiológico. La reparación directa de los nervios es una opción clínica en el tratamiento de heridas traumáticas. Sin embargo, esta coaptación directa de la sutura de extremo a extremo se limita únicamente a huecos de corta distancia. El criterio de referencia clínico para la reparación de huecos más grandes es el injerto nervioso autólogo. La principal ventaja de los autoinjertos es su estructura morfológicamente nativa que sirve como guía física para la regeneración de axones desde el muñón del nervio proximal al distal. Sin embargo, el autoinjerto está ligado a varias desventajas, tales como la limitación de los emplazamientos del donador para recoger el injerto o la morbilidad que tiene asociada en el emplazamiento del donador, incluyendo la pérdida de la función nerviosa, formación de neuroma doloroso e hiperestesia.

Estos aspectos demuestran que el criterio de referencia actual no es un procedimiento óptimo para la reparación nerviosa y por tanto, se están investigando exhaustivamente otros enfoques alternativos a los auto-injertos. Además del tejido nervioso para superar los huecos defectuosos, se han probado otros materiales autólogos como injertos venosos o músculos. Sin embargo, los resultados pre-clínicos y clínicos en los últimos años siguen siendo insatisfactorios.

Los enfoques en la ingeniería genética (TE) han abierto nuevas oportunidades en la reparación de nervios periféricos. Como resultado, se están investigando los conductos nerviosos guía (NGC) compuestos de polímeros sintéticos o naturales para superar los defectos nerviosos. El fundamento de los NGC es entubar los muñones del nervio y el hueco entremedias para garantizar un entorno protegido del tejido nervioso nuevo que se forma.

A pesar de los diferentes biomateriales sintéticos y naturales que se están evaluando pre-clínica y clínicamente para superar los defectos nerviosos, sus beneficios terapéuticos siguen sin ser satisfactorios.

En los últimos años, la fibroína de seda ha atraído el interés como biomaterial adecuado para la regeneración de nervios periféricos. En diversos estudios, se ha demostrado que SF compromete numerosas características potenciales que favorecen su uso como NGC, tales como la estabilidad mecánica, la lenta velocidad de degradación, la neuro-biocompatibilidad y su soporte de regeneración nerviosa. Además de mantener la biocompatibilidad, un NGC debería satisfacer otras tareas diversas, incluyendo su función como barrera para la infiltración de fibroblastos o su resistencia mecánica contra la compresión desde el tejido que lo rodea. Se han descrito ya varios procedimientos para producir conductos fabricados con SF. El objetivo de generar un tubo a base de SF en ingeniería de tejidos no se restringe al campo de la regeneración nerviosa, sino que también hay grupos de investigación que están abordando la ingeniería de tejidos vasculares. Una gran mayoría de estos enfoques en ingeniería de tejidos vasculares y nerviosos emplean electrohilatura para generar estructuras tubulares como consecuencia de su alta capacidad de control. Otras técnicas incluyen inmersión, hilatura de gel o moldeo. Todos los procesos de preparación que se han mencionado se basan en SF ya sea procesado desde soluciones acuosas o disolventes orgánicos. Con la presente invención, se utilizan construcciones de seda cruda obtenida por ingeniería textil como materia prima para superar un defecto nervioso.

En los ejemplos de la presente invención, se ha demostrado que el procedimiento de acuerdo con la presente invención es adecuado para generar un NGC de SF con unas propiedades topográficas mecánicas y anisotrópicas diferenciadas y se ha demostrado su biocompatibilidad y funcionalidad *in vitro* e *in vivo* en un modelo de lesión del nervio ciático. En los ejemplos de la presente invención, se produjo un conducto nervioso guía (NGC) utilizando una estructura tubular de SF obtenida por ingeniería textil de seda cruda como materia prima y tratada posteriormente

con CaCl_2 / H_2O /etanol, AF y metanol. Todos estos tratamientos conducen a cambios morfológicos en la superficie de la pared tubular, formando una capa de fibras de seda fusionadas. Como resultado de esta anisotropía, la elasticidad del SF-NGC mejora drásticamente y se previene la infiltración en la cavidad del SF-NGC. Los experimentos de cultivos celulares *in vitro* así como la evaluación *in vivo* preliminar en un modelo de lesión del nervio ciático de rata presentó unos resultados prometedores que demuestran que SF-NGC preparado de acuerdo con la presente invención soporta la regeneración nerviosa de una manera casi comparable a la del injerto autólogo - el criterio de referencia actual para superar los defectos nerviosos clínicamente. Por otra parte, el uso de colágeno como carga para la cavidad de SF-NGC no condujo a resultados superiores en comparación con tubos vacíos. El SF-NGC de la presente invención, especialmente con la adición de una carga en el espacio interior que contiene factores de crecimiento neurotróficos y células accesorias, como SLC, representa un procedimiento terapéutico alternativo en el tratamiento de defectos neuronales grandes, independientemente de los injertos nerviosos autólogos.

REIVINDICACIONES

- 5 1. Procedimiento de producción de productos de seda tridimensionales, en el que se trata un producto de seda tridimensional con un disolvente de seda durante un período de tiempo limitado para obtener una disgregación parcial del producto de seda, tras lo cual, se restablece el producto de seda parcialmente disgregado con inducción física de lámina β , por tratamiento con una solución de restablecimiento, en el que la solución de restablecimiento es ácido fórmico, preferentemente de 90 a 100 % de ácido fórmico, especialmente de 97 a 99 % de ácido fórmico.
2. Procedimiento de acuerdo con la reivindicación 1, en el que el disolvente de seda comprende LiBr, LiSCN, acetato de 1-etil-3-metilimidazolio, hexafluoro-2-propanol (HFIP), una mezcla que comprende etanol y CaCl_2 o una mezcla que comprende metanol y nitrato cálcico; o mezclas de los mismos.
- 10 3. Procedimiento de acuerdo con la reivindicación 1 o 2, en el que se usa etanol en una solución acuosa que contiene de 1 a 50 % (v/v) de etanol, preferentemente de 5 a 40 % (v/v) de etanol, especialmente de 10 a 30 % (v/v) de etanol.
4. Procedimiento de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en el que el producto de seda tridimensional es una tela tejida, una tela no tejida, un tubo, un producto de punto o un producto prensado.
- 15 5. Procedimiento de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en el que el producto de seda es un producto de fibroína de seda o un producto tejido de fibras de seda naturales.
6. Procedimiento de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en el que el producto de seda se fabrica de fibras del capullo del gusano de seda (*Bombyx mori*).
- 20 7. Procedimiento de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en el que el producto de seda se fabrica de fibras reconstituídas fabricadas de soluciones de fibroína, especialmente, soluciones de fibroína recombinante.
8. Procedimiento de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, en el que el producto de seda es un implante médico, preferentemente, un stent, un injerto vascular, un conducto nervioso, un andamio de tejido, preferentemente, tendón, bronquios o tráquea, o una malla para hernias.
- 25 9. Procedimiento de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, en el que el tratamiento con un disolvente de seda se lleva a cabo a una temperatura de 20 a 100 °C, preferentemente de 50 a 78 °C, especialmente de 70 a 77°C.
10. Procedimiento de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, en el que la solución de restablecimiento es ácido fórmico y en el que el producto restablecido se trata posteriormente con metanol.
- 30 11. Procedimiento de acuerdo con la reivindicación 10, en el que el disolvente de seda comprende una mezcla que comprende etanol y CaCl_2 .
12. Producto de seda tridimensional obtenible mediante un procedimiento de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 11 que comprende al menos un apilamiento de dos capas de filamentos de fibroína, una capa de fibroína homogénea y una capa de fibroína fibrosa.
- 35 13. Producto de seda tridimensional de acuerdo con la reivindicación 12, en el que el producto es un stent, un injerto vascular, un conducto nervioso, un andamio de tejido, preferentemente tendón, bronquios o tráquea, o una malla para hernias.
- 40 14. Producto de seda tridimensional de acuerdo con la reivindicación 12 o 13, en el que la capa de fibroína homogénea tiene un diámetro de al menos 20 μm , preferentemente al menos 50 μm , especialmente al menos 100 μm .

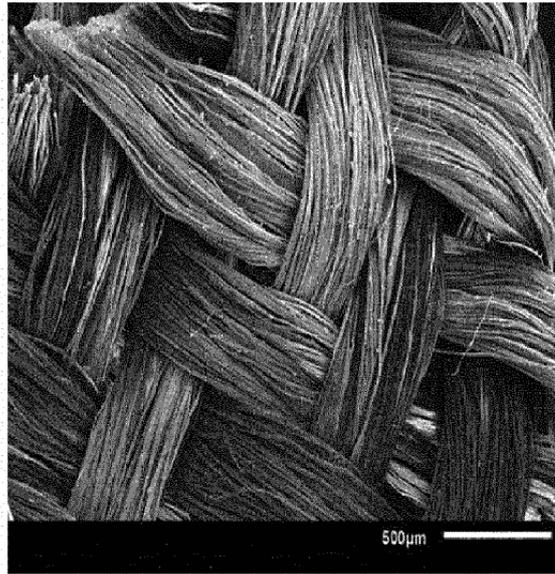
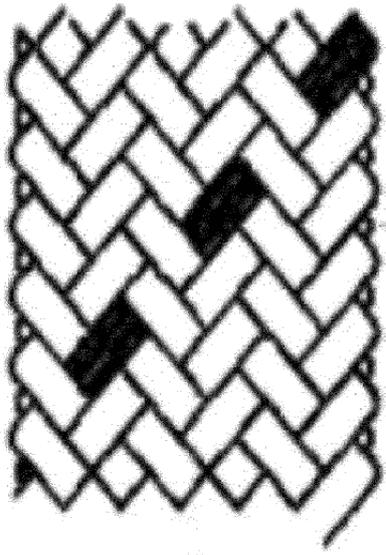


Fig.1

Fig.2

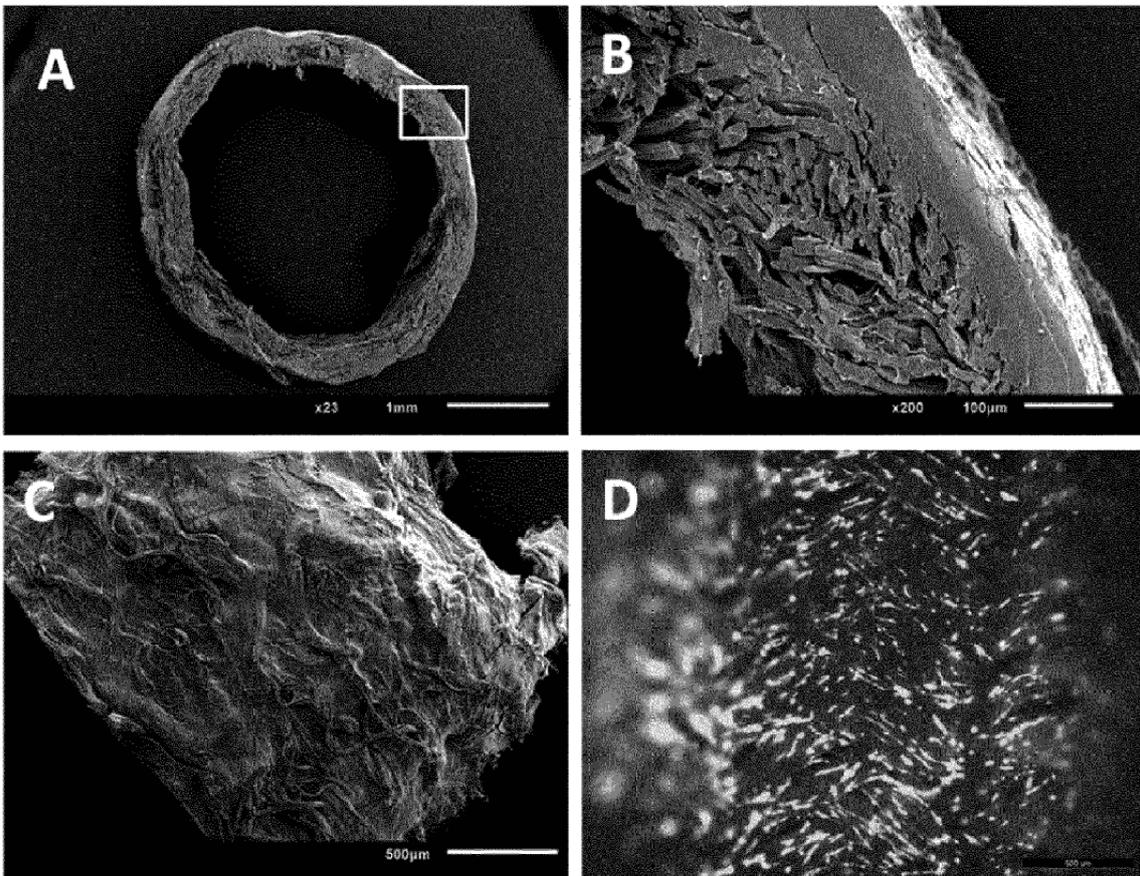


Fig. 3

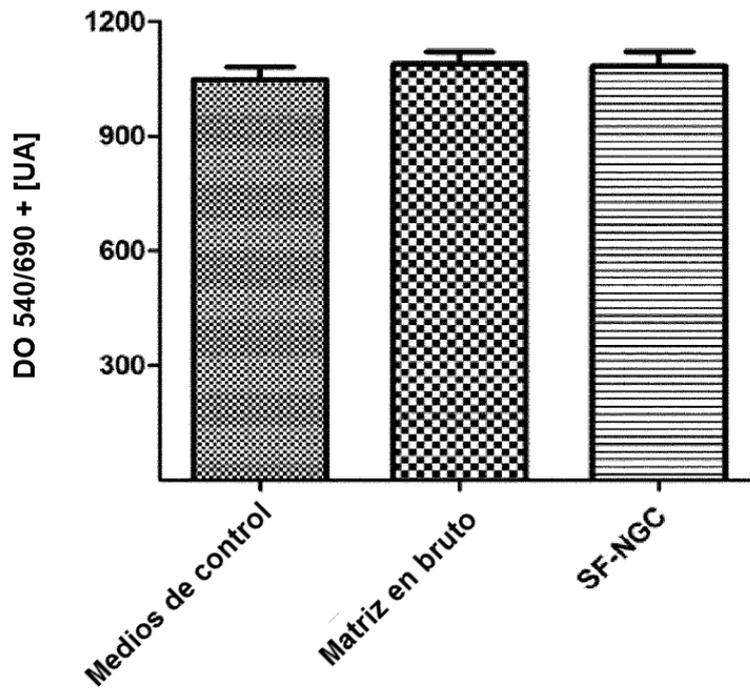
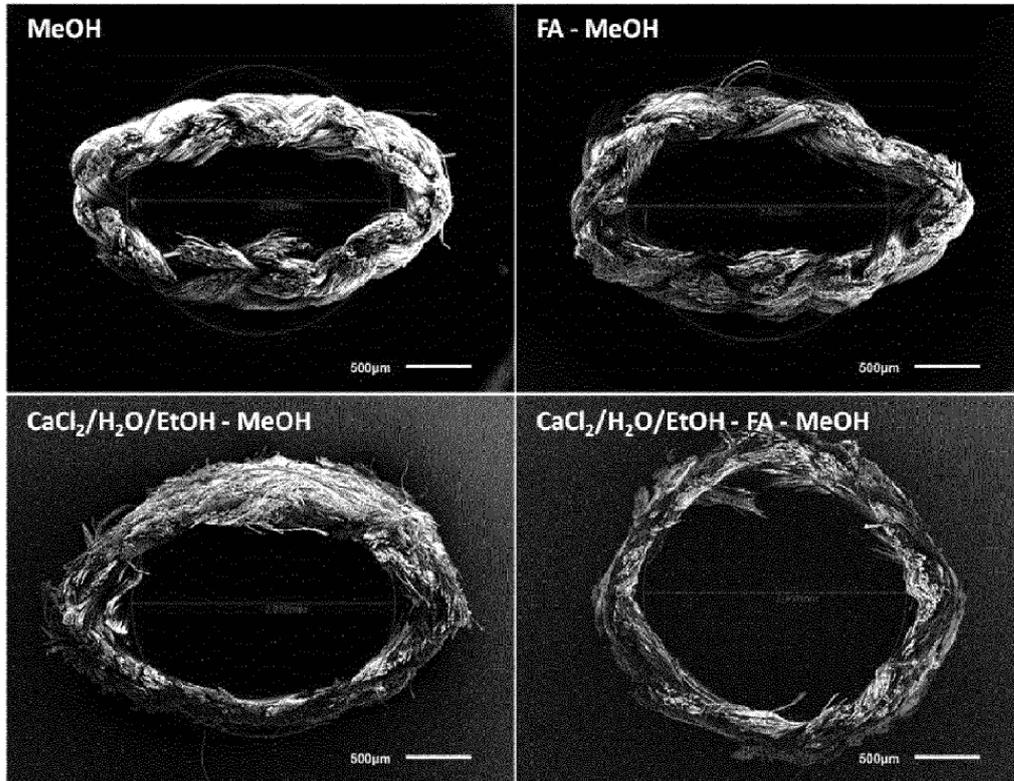


Fig. 4

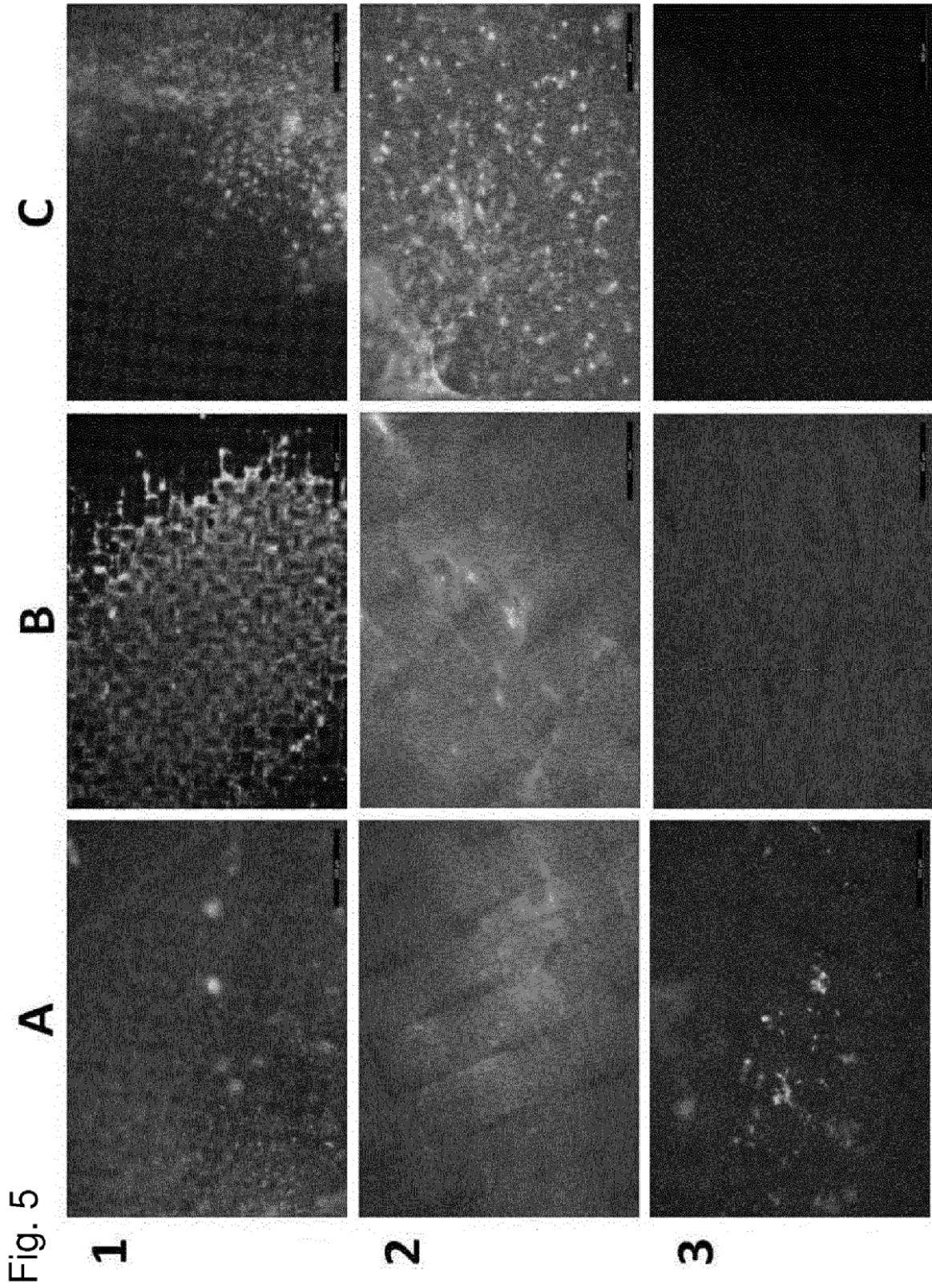


Fig. 6

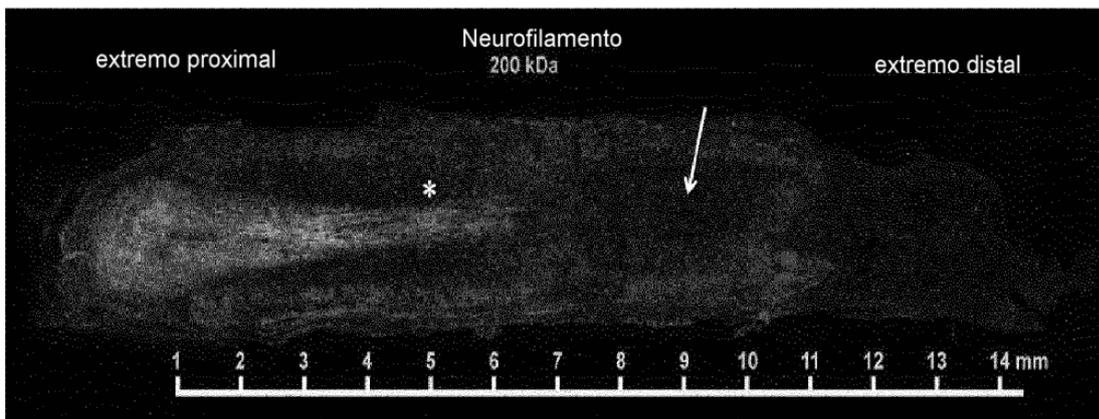
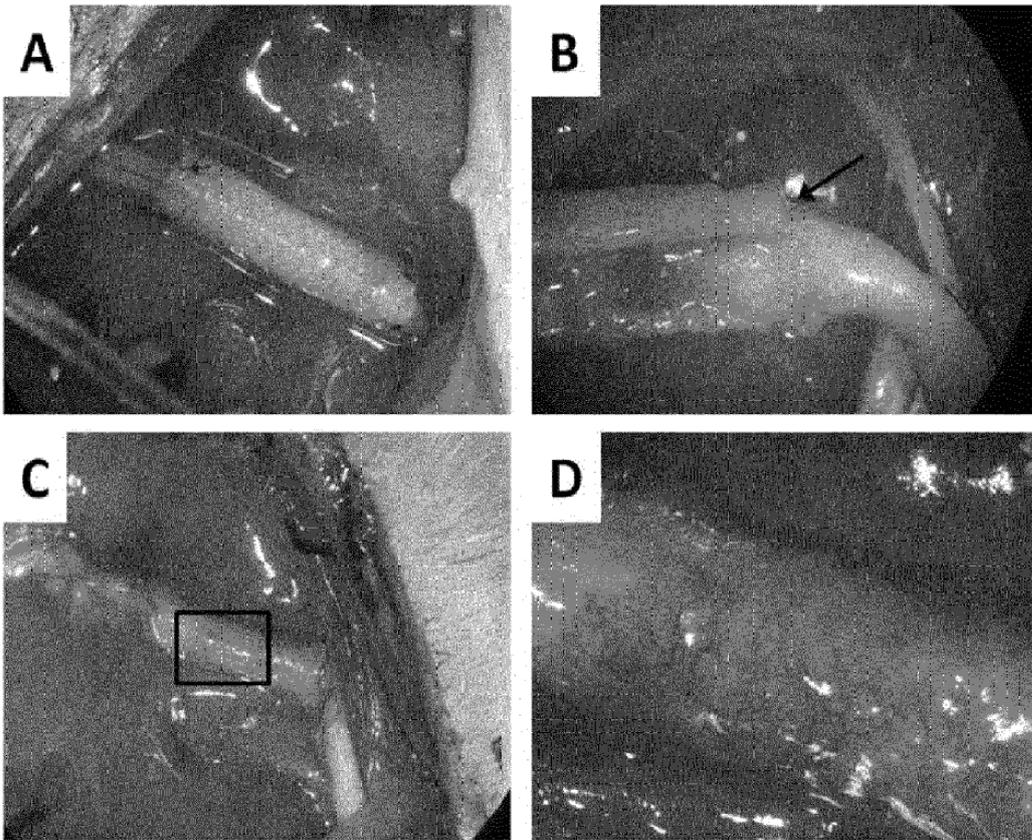


Fig. 7

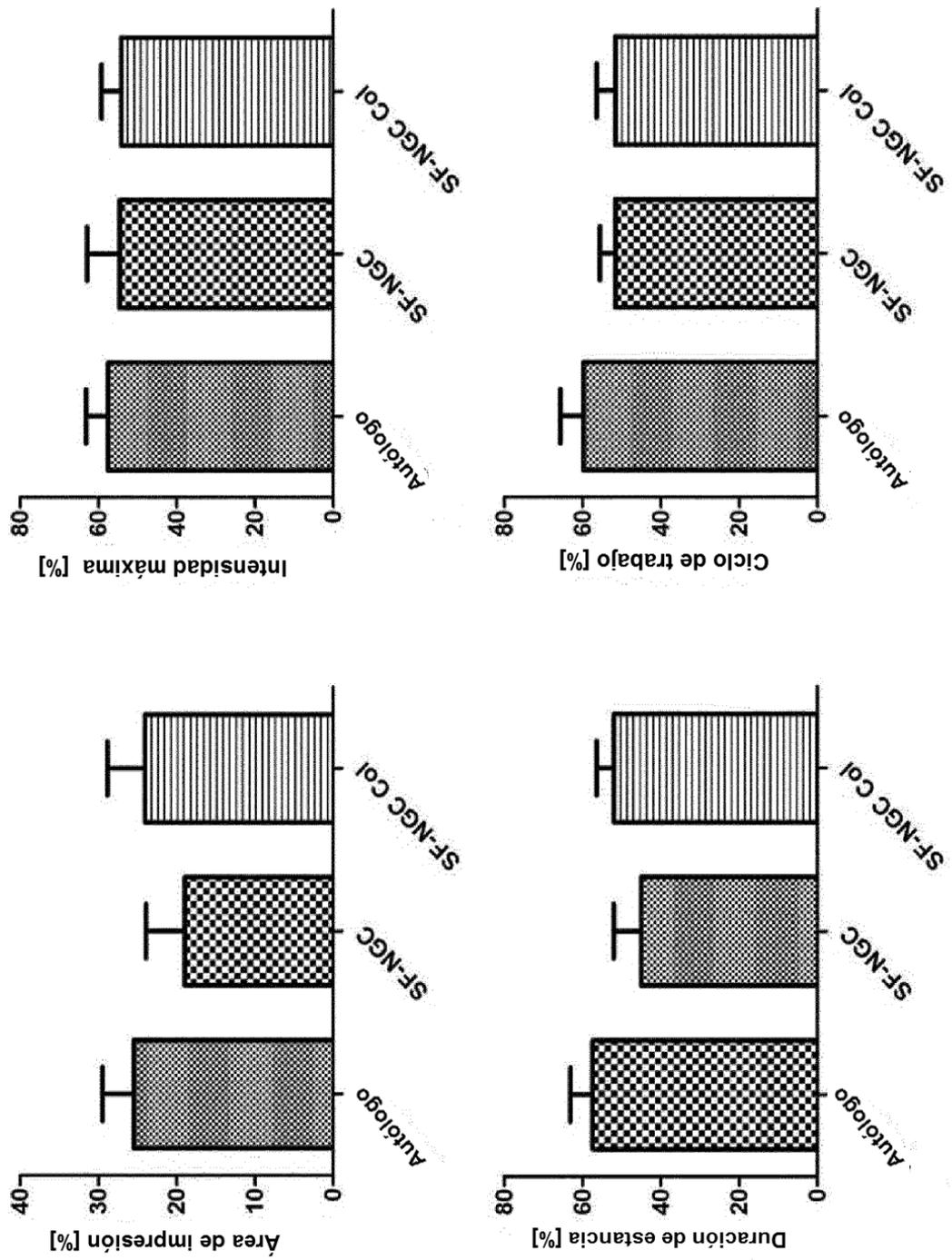
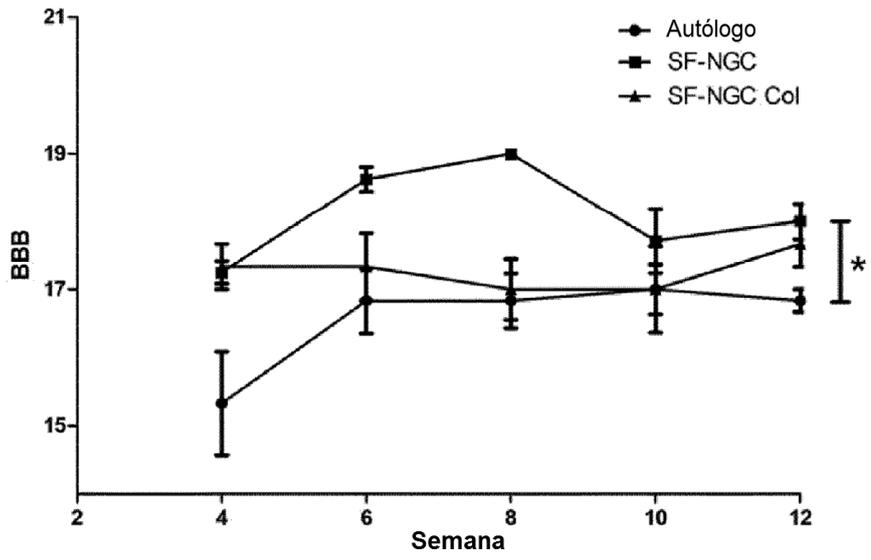


Fig. 8

Fig. 9



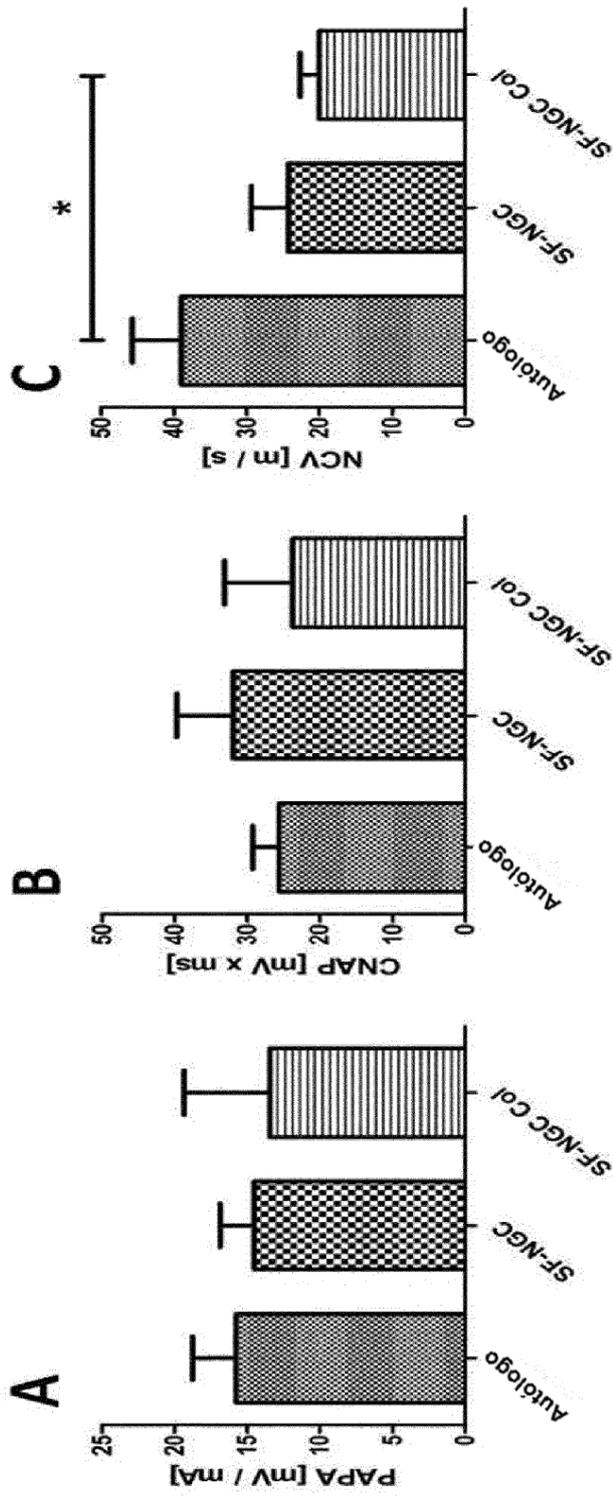


Fig. 10

Fig. 11A

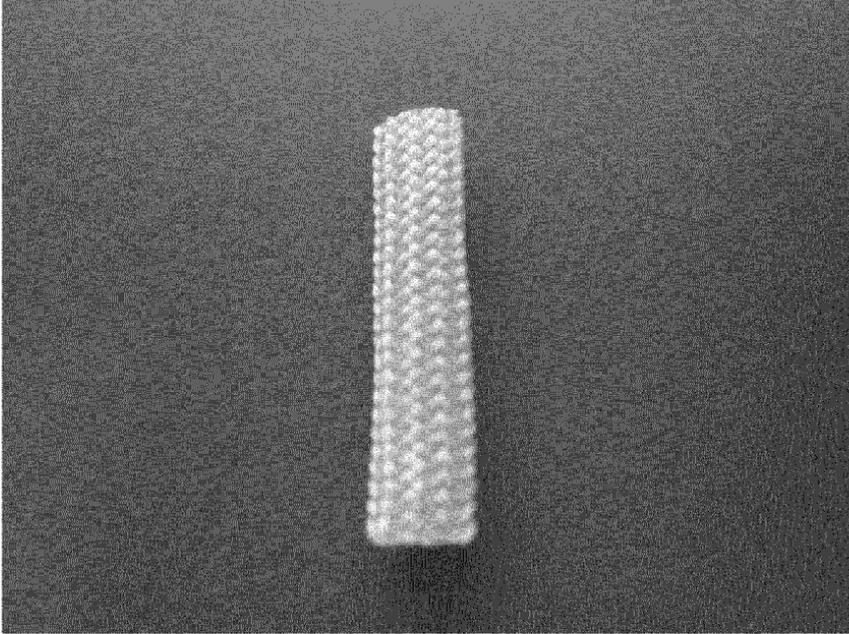


Fig. 11B

Fig. 11C

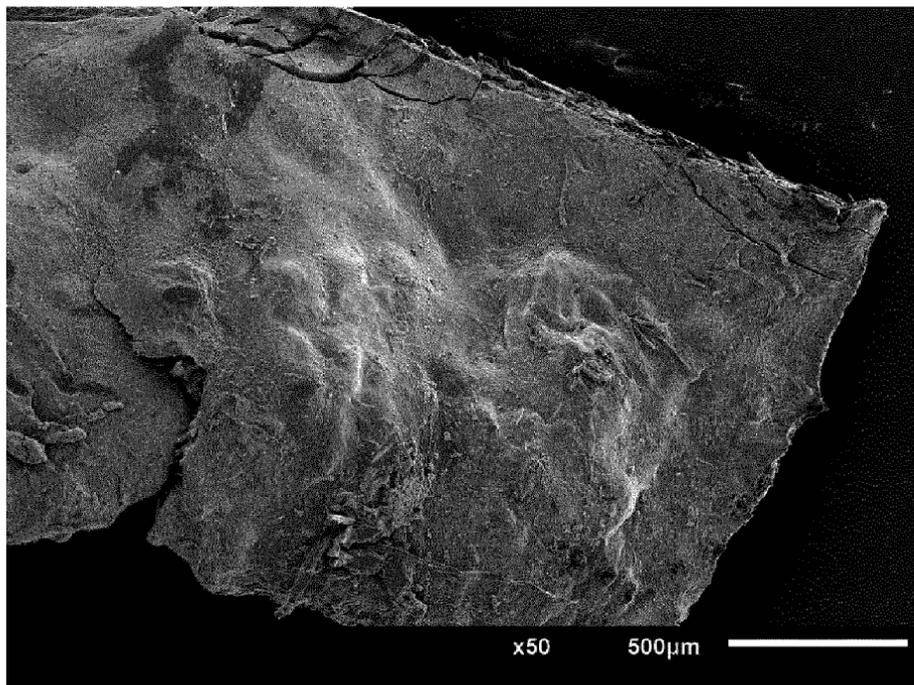
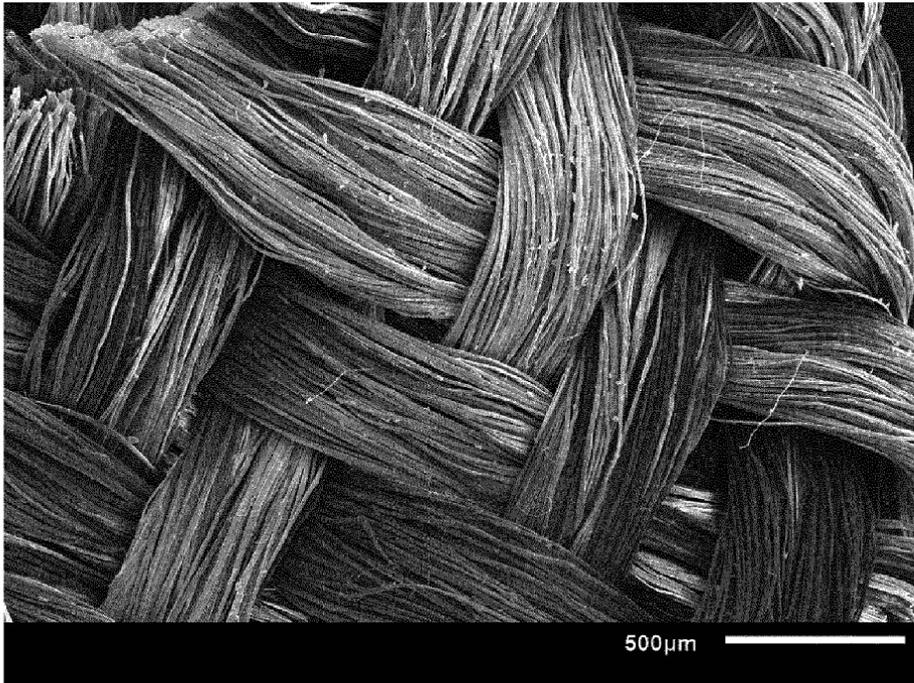


Fig. 11D

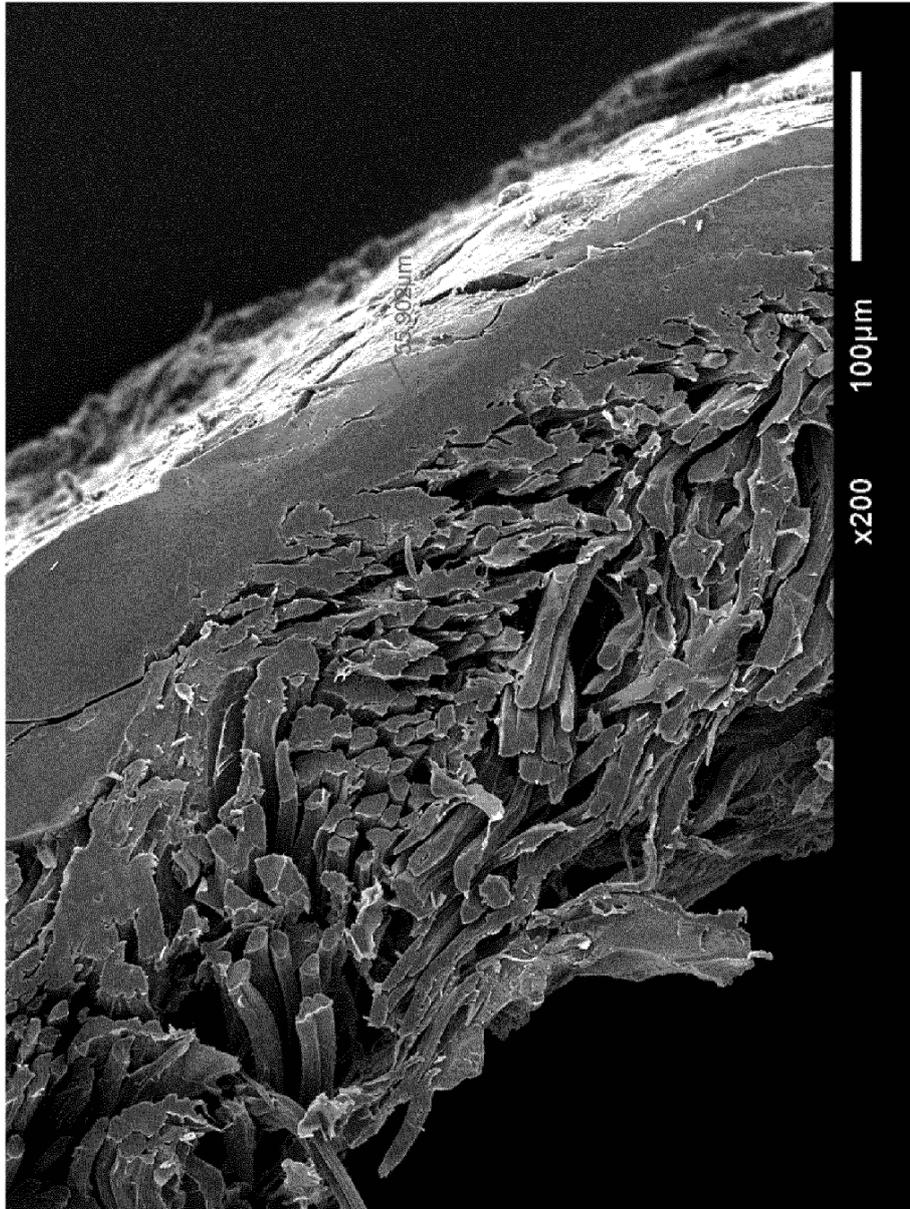


Fig. 11E

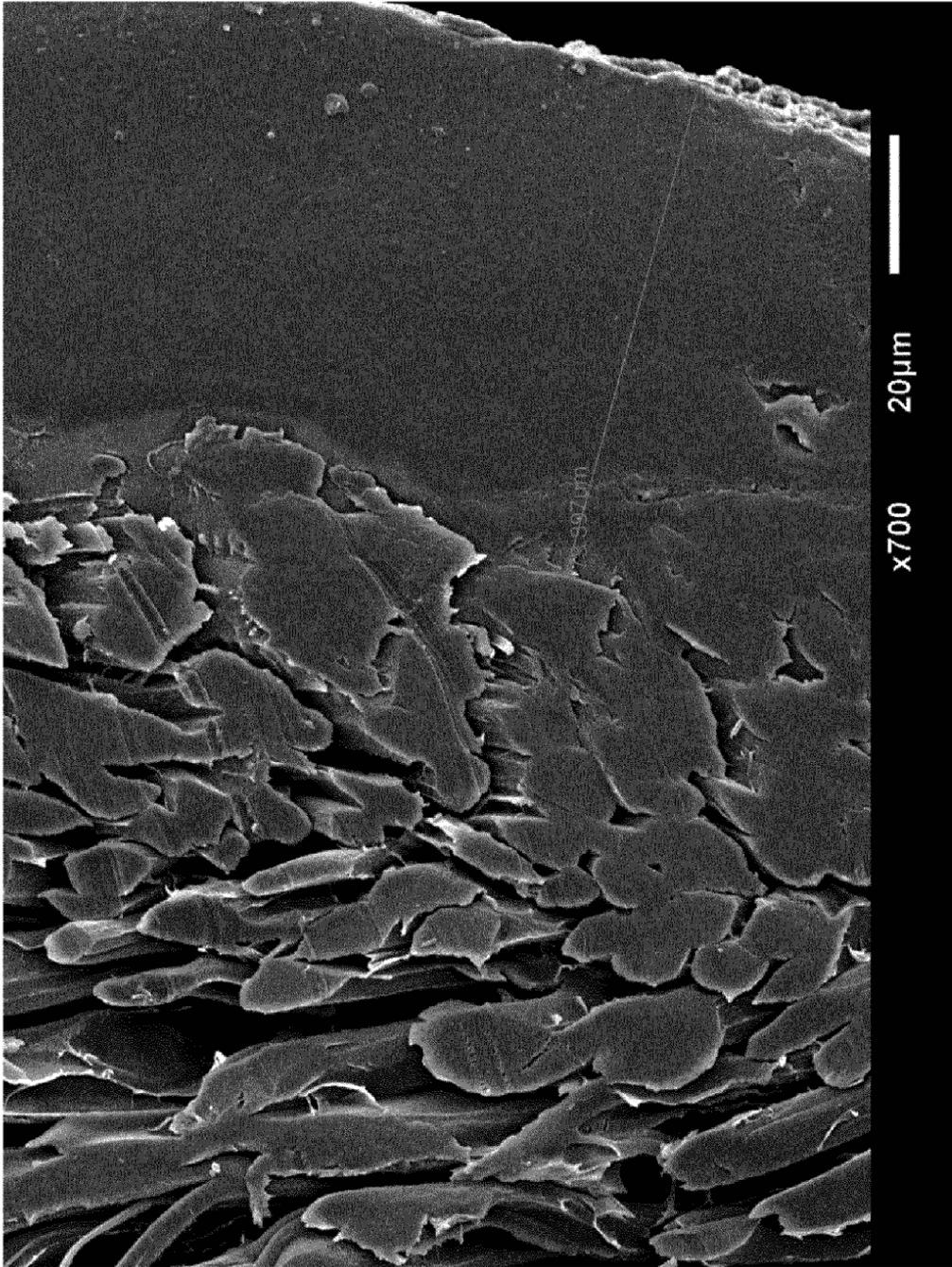


Fig. 11F

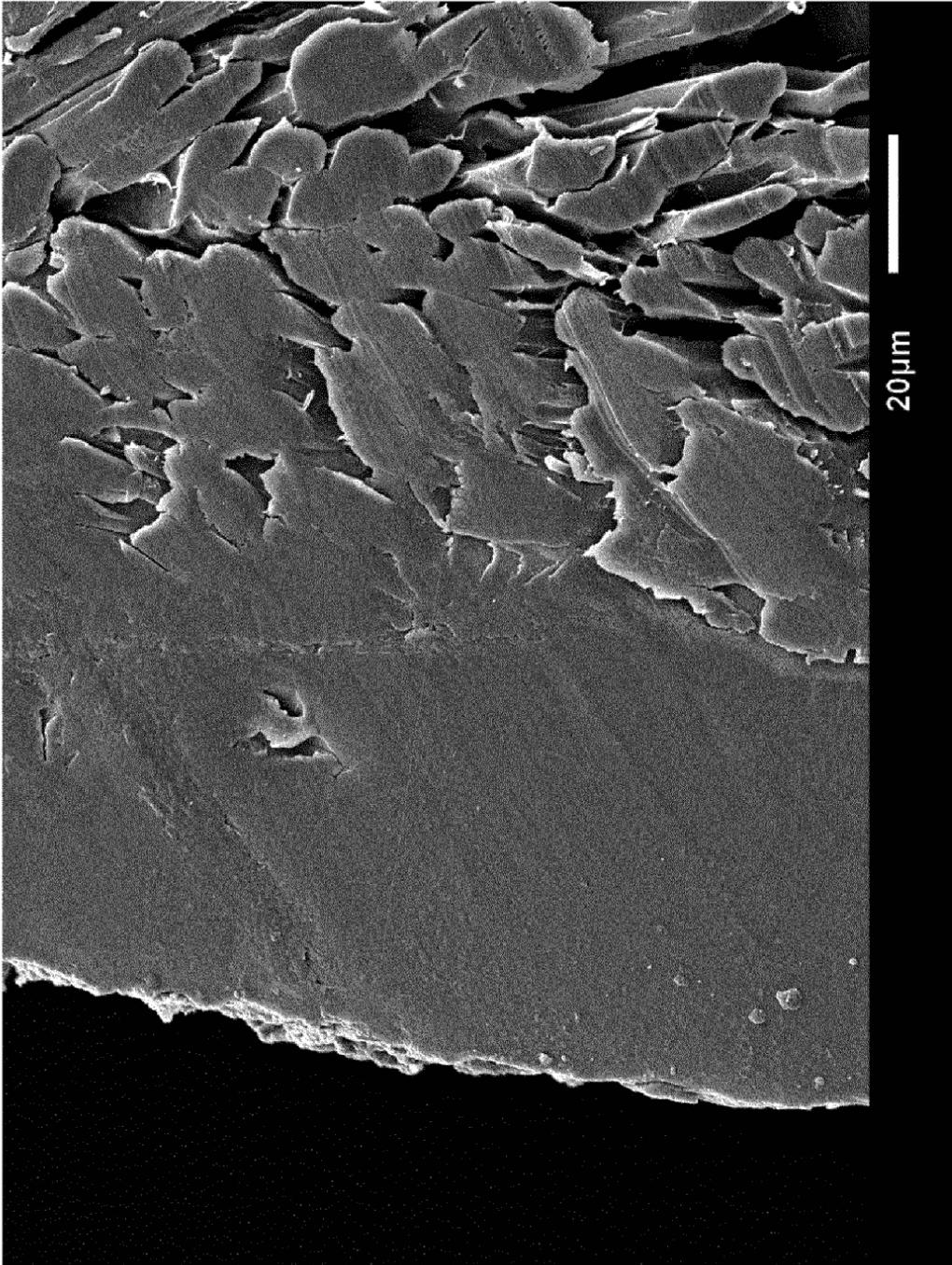


Fig. 11G

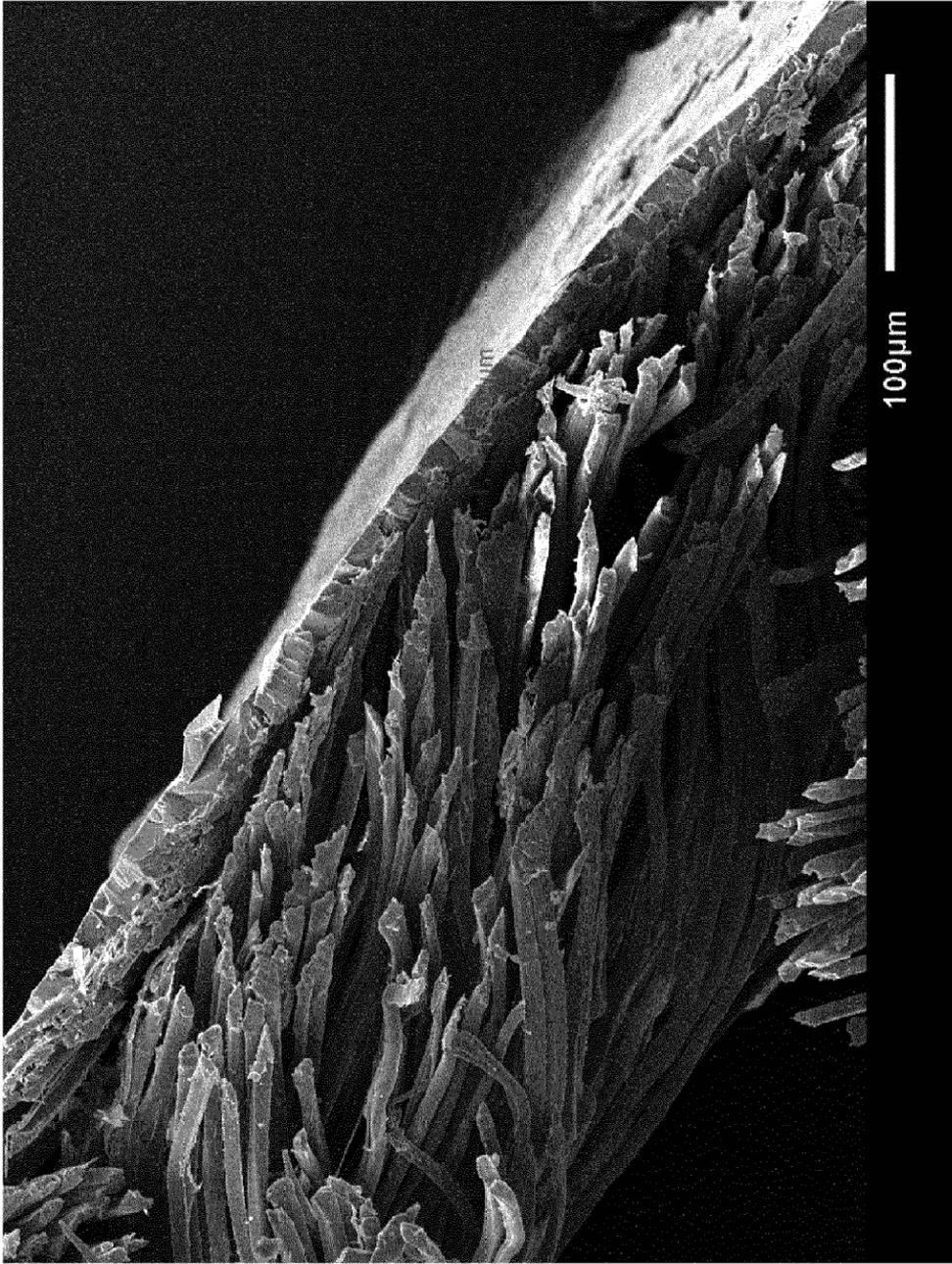


Fig. 11H

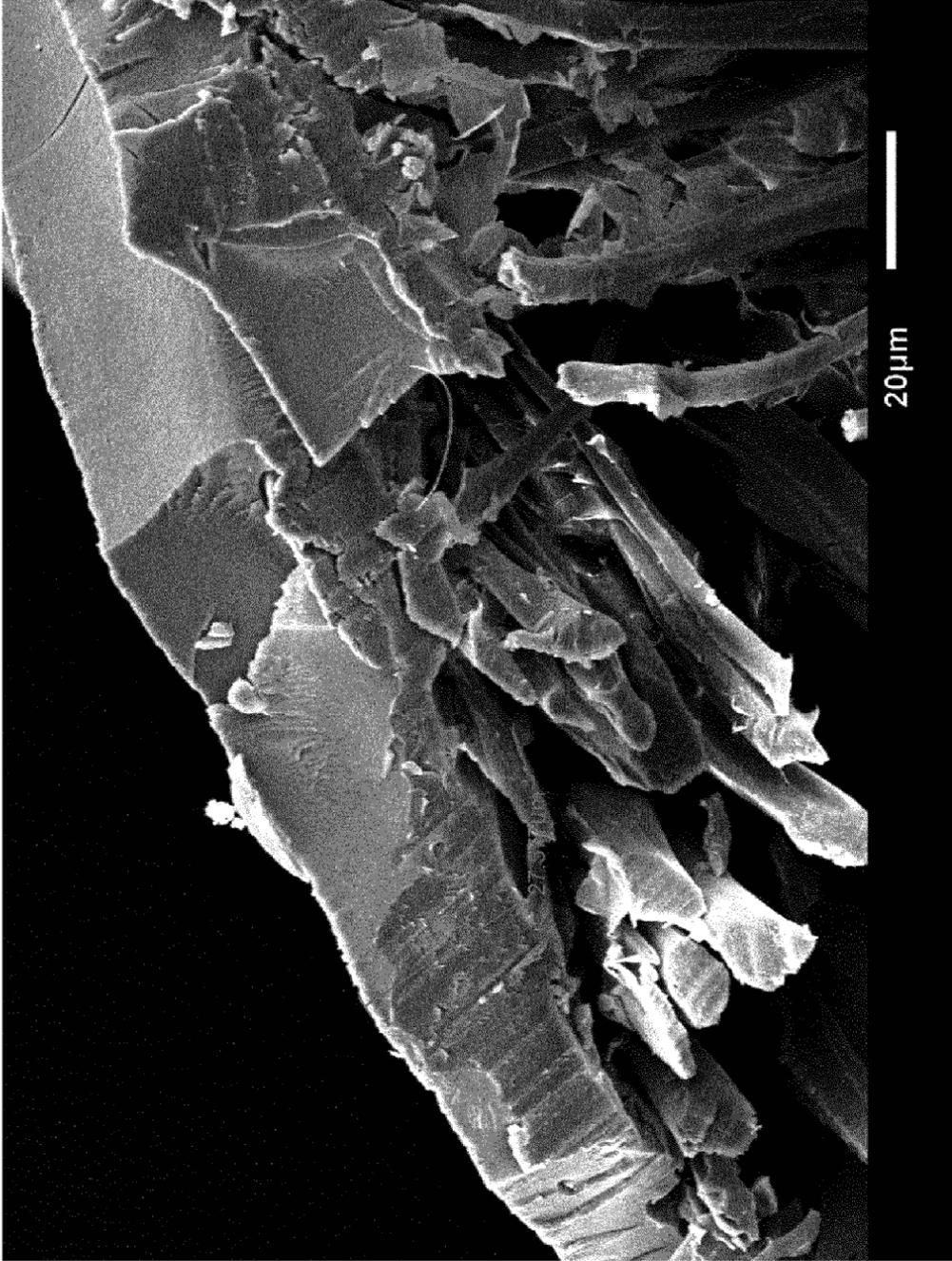


Fig. 11I

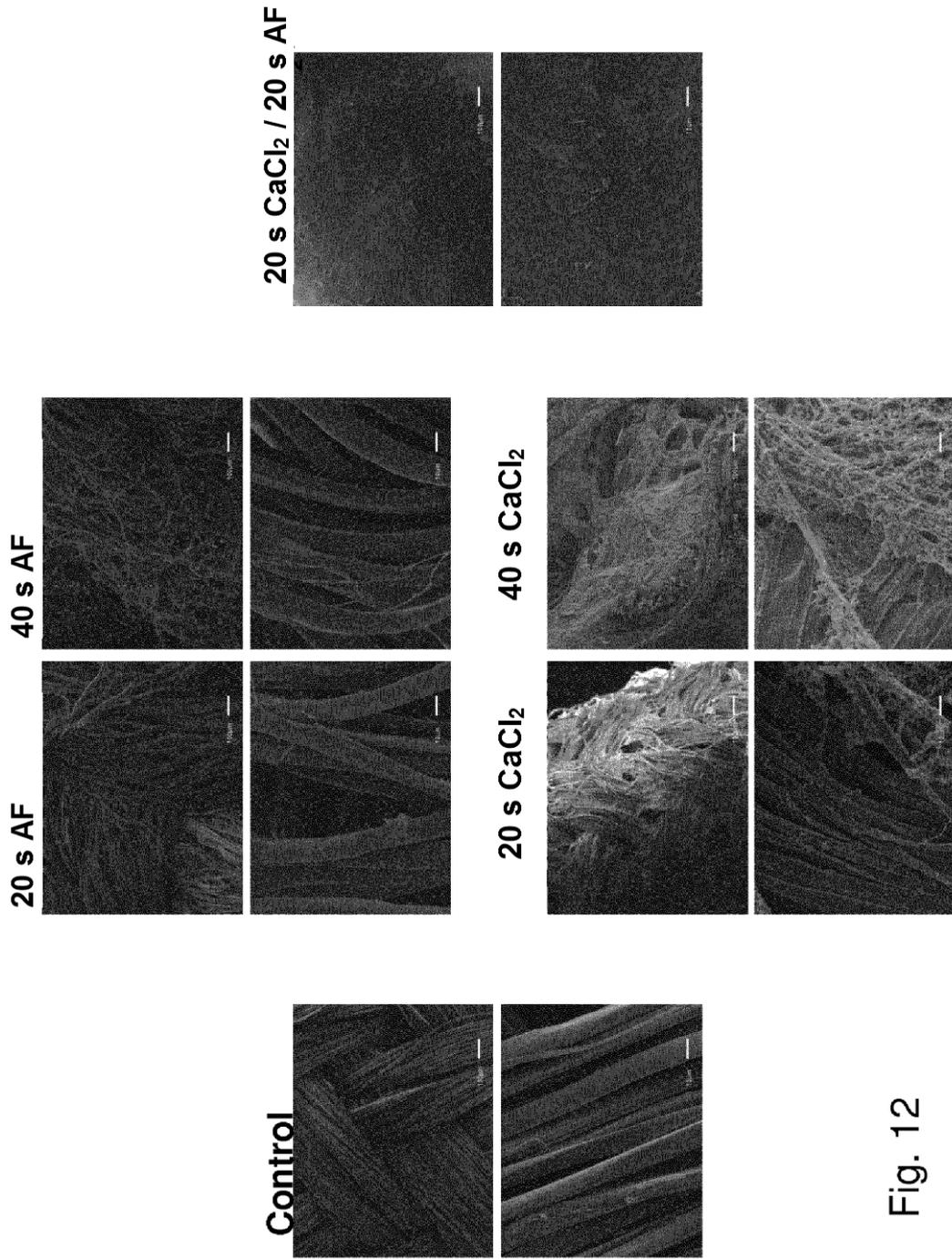


Fig. 12

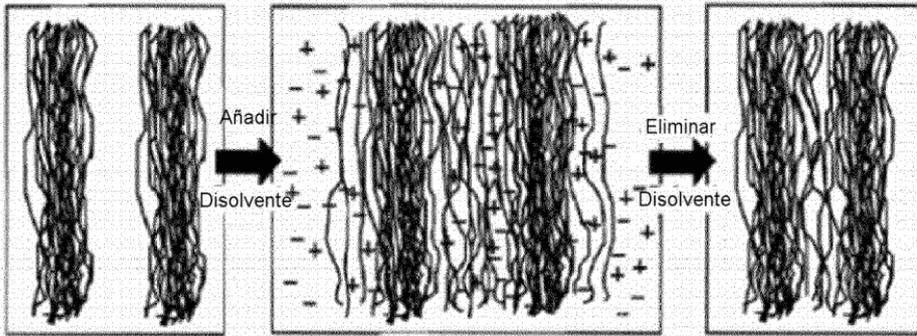


Fig. 13A

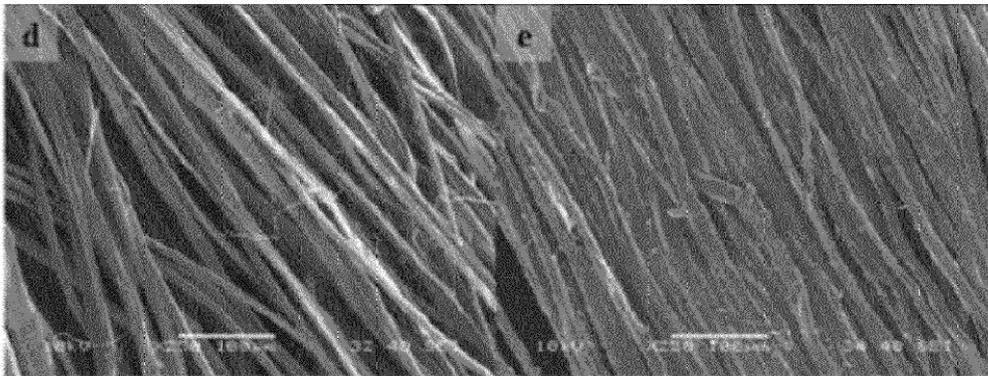


Fig. 13B

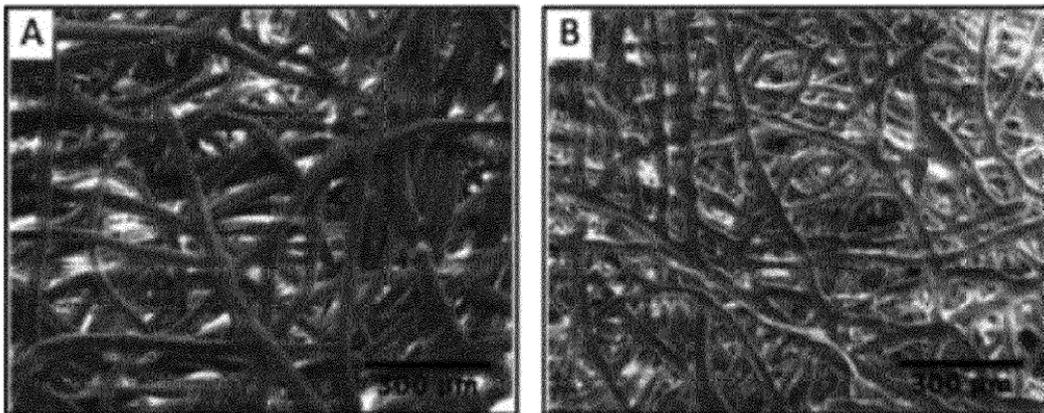


Fig. 13C