(19) OFICINA ESPAÑOLA DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

(11) Número de publicación: **2 658 955**

(51) Int. Cl.:

D01C 3/02 (2006.01)
A61L 27/22 (2006.01)

(12) TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA T3

(86) Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **27.09.2013** **PCT/EP2013/070213**

(87) Fecha y número de publicación internacional: **03.04.2014** **WO14049129**

(96) Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **27.09.2013** **E 13773662 (5)**

(97) Fecha y número de publicación de la concesión europea: **15.11.2017** **EP 2904134**

(54) Título: **Producto fabricado con fibras de seda nativa**

(30) Prioridad:

27.09.2012 EP 12186282

(45) Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
13.03.2018

(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 2 658 955 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 con fibras de seda nativa

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

Históricamente, la seda se ha utilizado en suturas biomédicas desde hace décadas, en las que se han observado respuestas inmunitarias potenciales del huésped. Esto puede ser la mayor preocupación con el uso de sedas que han llevado a su indiferencia en aplicaciones biomédicas en el pasado. La causa principal para provocar la activación de la respuesta inmunitaria se ha asociado con la sericina (revisado en: Altman y col., *Biomaterials* 24 (2003), 401-416). Por lo tanto, la eliminación adecuada de sericina de la seda cruda es una etapa crítica en la preparación de la seda para la ingeniería tisular y aplicaciones de medicina regenerativa para evitar problemas de biocompatibilidad.

En la mayoría de los casos, la seda del gusano de seda se obtiene de los capullos de las larvas del gusano de seda de morera *Bombyx mori.* La fibra de capullos de un único gusano de seda consiste en dos núcleos de filamentos de fibroína rodeados por una proteína similar al pegamento llamada sericina, que fija las fibras de fibroína entre sí. La fibroína y la sericina representan aproximadamente un 75 y 25 % en peso, respectivamente.

Morfológicamente, la fibroína de la seda se caracteriza por su estructura fibrosa altamente orientada y cristalina. Esta estructura es responsable de su insolubilidad en la mayoría de disolventes, tales como agua, etanol, ácidos diluidos y bases. En contraste con la fibroína, la proteína globular sericina es fácilmente soluble en disolventes acuosos. En la industria textil, la eliminación de sericina también resulta interesante debido a que el brillo del tejido de seda permanece oculto por la sericina. Por lo tanto, los grupos de investigación que trabajan en la seda no se limitan al campo biomaterial sino también a las búsquedas de la industria textil para procedimientos óptimos de desgomado. Este hecho conduce a la existencia de varios procedimientos de desgomado, incluyendo soluciones alcalinas sin detergentes, urea, ácido tartárico, ácido cítrico, o enzimas, tales como papaína o endopeptidasa. La posibilidad de utilizar ácido bórico en combinación con sales de borato como agente de desgomado se ha descrito en el campo de la ingeniería textil. En estos estudios, se utilizaron tampones borato para desgomar sólo fibras de seda cruda sin procesar (Jiang y col. *Materials Letters* 60/7 (2006), 919-925) o en combinación con un agente tensioactivo (documento JP 2 269870 A) o como se denomina "agente de lavado" para fibras individuales o telas tejidas. En el último caso, se utilizaron tampones borato para lavar la superficie de las fibras para hacerlo accesible a los procedimientos de ingeniería textil adicionales, tales como blanqueado, teñido, etc., sin el fin de completar la eliminación de sericina (documento JP 1 229803 A). Tales productos, aún contienen, por lo tanto, una alta cantidad de sericina (p. ej., más de la mitad de sericina total está aún presente en el producto). La eliminación incompleta de sericina sería insuficiente para el campo de la medicina debido a la obtención de reacciones inmunológicas resultantes de la sericina residual. En consecuencia, no es relevante para el campo actual de aplicación.

Debido a su gran versatilidad y funcionalidad consistente, los tampones borato se utilizan tradicionalmente en numerosas aplicaciones bioquímicas y biotecnológicas. En este contexto, cabe señalar que los tampones borato se han utilizado para mantener el valor del pH en un intervalo de trabajo óptimo de la proteasa específica en procedimientos de desgomado basados en enzimas (documento CN 102 605 439 A (resumen)). Esto significa que, en este caso, el tampón no se utiliza como un agente de desgomado en sí, sino como un agente para proporcionar el intervalo de trabajo óptimo en términos de pH para el desgomado de la proteasa. De una manera similar, se ha utilizado ácido bórico para controlar el pH en los procedimientos de desgomado de ingeniería textil que utilizan jabones (documento FR 2528076 A1).

La forma clásica de desgomado es la ebullición de la seda cruda en soluciones alcalinas sin detergentes que ayudan en la eliminación de la sericina de la estructura fibrosa. También se ha señalado que es común el uso de una solución de carbonato de sodio 0,02 M a 100 ºC durante 30-60 min para efectuar el desgomado, especialmente en el campo de la investigación en ingeniería tisular. Con frecuencia, este desgomado alcalino se lleva a cabo como tratamiento por lotes utilizando jabones o detergentes, además de álcali.

Sin embargo, diferentes estudios mostraron que la eliminación de sericina hace que la fibra de seda se desgaste y debilite su propiedad estructural, lo cual hace que resulte difícil elaborar los textiles (p. ej., punto o trenzado) en armazones para aplicaciones de ingeniería tisular (Liu y col. *J. Biomed. Mater. Res. B Appl. Biomater*. 82 (2007), 129-138). Por lo tanto, en algunos estudios, el armazón de seda se fabrica por adelantado y posteriormente se realiza el procedimiento de desgomado (Fan y col., *Biomaterials* 30 (2009), 4967-4977; Fan y col., *Biomaterials* 29 (2008), 3324-3337; Chen y col., *Biomaterials* 29 (2008), 3683-3692). Pero es importante señalar que la base del armazón de todos estos estudios son mallas "simples" (Chen y col., *Biomaterials* 29 (2008), 3683-3692) con un espesor que no supera los 500 µm. Además, las mallas descritas se caracterizan por bajos niveles de jerarquía geométrica, p. ej., técnicas simples de tricotado textil. En comparación con los armazones elaborados de textiles de orden superior, las fibras individuales de seda se exponen bastante bien a la solución de desgomado y por lo tanto pueden ser desgomadas utilizando las soluciones clásicas de carbonato de sodio (véase la Fig. 11A y 11B).

Una opción altamente intensiva en mano de obra para potenciar las características de procesamiento de fibras exentas de sericina fue propuesta por Liu y col., 2007. En este estudio, se describe un procedimiento para reemplazar sericina con gelatina por medio de reticulación química de fibras de seda exentas de sericina con gelatina.

Altman y col. (*Biomaterials* 23 (2002), 4131-4141 exploraron el potencial de las fibras de fibroína de seda nativa (hilos) como armazones 3D para la ingeniería tisular de los ligamentos cruzado anterior (LCA) en cultivos con carga mecánica dinámica. Tras la extracción de sericina, las fibras de fibroína de seda se cablearon en matrices de cable de acero de 6 cuerdas con elasticidad mejorada sin sacrificar la resistencia a la tracción cuando se compara con una matriz equivalente formada a partir de fibras paralelas. Esta matriz tenía una estructura jerárquica similar a la de las fibras de colágeno en el LCA nativo y las propiedades mecánicas eran comparables a las del LCA nativo de ser humano con respecto a la resistencia, rigidez, límite de elasticidad, y porcentaje de elongación de ruptura. Además, la geometría del cable de acero aumenta la superficie para la unión celular y la deposición de matriz extracelular (MEC) y minimiza las limitaciones de transferencia de masa, todo lo cual contribuye a una formación de neotejidos potenciada. Los armazones de fibroína de seda soportaron la fijación, la propagación, la proliferación y la diferenciación de células madre mesenquimales (CMMs) derivadas de médula ósea de ser humano adulto.

A pesar del uso emergente de la seda en aplicaciones de ingeniería tisular y una gran cantidad de investigación en el procedimiento de desgomado por grupos de investigación biomédica e industrial, aún existe una falta de conocimientos acerca de las opciones para desgomar construcciones de ingeniería textil de alta jerarquía geométrica. Por lo tanto, actualmente, no existe procedimiento de desgomado alguno disponible que sea capaz de eliminar la sericina de una matriz de fibra de seda cruda de *Bombyx mori* compacta y de alto orden, p. ej., que tiene por objeto la ingeniería tisular del ligamento cruzado anterior.

En contraste, la provisión del material de seda para usos casi exclusivamente médicos emplea la disolución completa de las fibras de seda en sistemas acuosos, seguido de reprocesamiento de la solución de seda en formatos de material deseados, p. ej., mediante hilado, electrohilado, fundición de sistemas de disolventes acuosos u orgánicos, gelificación, formación de espuma, etc. (Vepari y col., 2007, documento US 5.252.285 A).

Sin embargo, estos materiales de seda reprocesada a partir de soluciones de fibroína difieren de las estructuras inherentes de seda natural (nativa), tales como disminución de la resistencia mecánica. Por otra parte, las fibras de seda se han utilizado más ampliamente como suturas para la ligación de heridas; sin embargo, las fibras tienen que ser desgomadas antes de la aplicación, debido a los efectos adversos causados por la sericina (Kaplan y col., *Biomaterials* 24 (2003), 401-416). La gran mayoría de los problemas de biocompatibilidad de suturas de seda se notifican con la seda virgen, en la cual la sericina aún cubre las fibras de fibroína del núcleo de seda. La inducción de asma y una regulación positiva de los niveles de inmunoglobulina E se pudieron observar en los pacientes suturados con seda virgen. En un estudio de Dewair y col., (*J. Allergy Clin. Immunol.* 76 (1985), 537-542), los niveles máximos de IgE específica, así como el grado de reacción positiva en pacientes sensibles a la seda podían verse en los grupos con el mayor contenido de sericina (en las muestras de seda ensayadas) en el ensayo cutáneo. Además, se pudo demostrar que la activación de células inflamatorias que incluyen macrófagos en torno a las fibras de seda virgen, mientras que en los grupos de control de fibras de fibroína exentas de sericina o recubiertas con gelatina, no se observó activación alguna. Es evidente que los biomateriales que se implantan no deben causar tal respuesta a cuerpos extraños. En consecuencia, los biomateriales fabricados de seda han de estar exentos de sericina. Sin embargo, debido a las propiedades negativas de las fibras de seda desgomada en el procedimiento de formación de biomateriales finales (p. ej., ligaduras), especialmente biomateriales tridimensionales, se necesitan procedimientos mejorados para proporcionar biomateriales a base de seda. Estos procedimientos deberían permitir un procedimiento de producción robusto, reproducible y fiable; por otra parte, los productos han de estar esencialmente exentos de sericina para permitir que los biomateriales producidos se apliquen especialmente en medicina. Por tanto, un objeto de la presente invención es proporcionar dicho procedimiento; tal procedimiento también debe ser específicamente adecuado para fines médicos, especialmente para terapia y cirugía.

Por lo tanto, la presente invención proporciona un procedimiento de producción de productos para implantes médicos tridimensionales de seda con más de un nivel de jerarquía geométrica, en el que las fibras de seda nativa se forman en un producto para implante médico tridimensional de seda y el producto de seda formado es sometido durante al menos 30 min a una etapa de desgomado, en el que un tampón borato se utiliza como agente de desgomado y en el que el producto de seda formado se pone en contacto con un tampón que contiene etanol acuoso antes de la etapa de desgomado, y en el que el producto para implantes médicos de seda tiene un contenido de sericina inferior a 0,1 % (p/p) y un espesor de al menos 0,5 mm.

El procedimiento según la presente invención permite el desgomado eficiente de la seda, especialmente el desgomado de productos tridimensionales. Considerando que los productos desgomados según la técnica anterior aún contienen al menos 1 % (p/p) (o incluso al menos 2 % (p/p)) de sericina, los productos según la presente invención están esencialmente exentos de sericina, lo que significa que el contenido de sericina es inferior a 0,1 % (p/p), preferentemente inferior a 0,05 % (p/p), especialmente inferior a 0,01 % (p/p) (también dependiendo, en la práctica, del procedimiento de detección de sericina que tiene diferentes límites de detección). Por ejemplo, para los productos presentados, no hay residuos de sericina visibles en el microscopio electrónico o no hay coloración de sericina visible en ensayos de tinción con sericina. Queda claro también que los productos textiles (tales como los

desvelados por el documento JP 2 269870 A o el documento JP 1 229803 A) con un alto contenido de sericina no son adecuados para el campo de la medicina y, por lo tanto, en principio, se excluyen en la presente invención (independientemente de la forma de sericina que haya sido (parcialmente) eliminada).

Sorprendentemente, se descubrió en el transcurso de la presente invención que la sericina puede eliminarse de manera eficaz de los productos tridimensionales de seda complejos fabricados de fibras de seda nativa con la etapa de desgomado según la presente invención. Esto permite la producción de un producto tridimensional con la fibra de seda natural (siendo parte la sericina de la fibra) que proporciona ventajas y posibilidades significativas debido a mejores propiedades de manipulación de las fibras de seda natural en comparación con las fibras de seda desgomada o fibras de seda reprocesada (a partir de soluciones de fibroína).

En contraste con los procedimientos de la técnica anterior, tales como el tratamiento con álcali o proteasa para el cual no se notificó el desgomado exitoso de tejidos de seda (Fan y col., 2008., 2009; Freddi y col., 2003), el procedimiento de desgomado proporcionado con la presente invención permite la obtención de productos tridimensionales de seda que están esencialmente exentos de sericina. Mientras que los procedimientos de la técnica anterior no tuvieron éxito en eliminar la sericina de hilos de trama muy torcidos p. ej., en telas y similares, el procedimiento de desgomado según la presente invención proporciona una eliminación de sericina necesaria para la aplicación médica.

Con la presente invención es posible por lo tanto producir estructuras tridimensionales complejas de seda de antemano y realizar la etapa de desgomado después. Esto permite la provisión de estructuras de seda más robustas y complejas que mediante el empleo de fibras de seda desgomada o fibras de seda reprocesada, lo cual es una ventaja significativa en la cirugía moderna. También el procedimiento de producción en su conjunto es, por lo tanto, más robusto y adecuado para la producción en masa industrial, ya que no sufre las propiedades debilitadas de las fibras desgomadas.

En la presente invención, "productos tridimensionales de seda" deberán no solamente ser entendidos como productos que no tienen ninguna de las tres dimensiones que son irrelevantes en comparación con las otros dos, sino como productos que tienen más de un nivel de jerarquía geométrica. Las estructuras con ingeniería textil con más de un nivel de jerarquía geométrica según la presente invención son estructuras tridimensionales complejas que tienen un diámetro con la dimensión más pequeña ("espesor") de al menos 0,5 mm. De hecho, se prefieren productos tridimensionales según la presente invención que tengan un diámetro con la dimensión más pequeña de al menos 1,0 mm, preferentemente de al menos 2,0 mm, especialmente de al menos 5,0 mm. En consecuencia, el armazón utilizado en la presente invención se puede subdividir en una parte de revestimiento y de núcleo (1er nivel jerárquico). La propia parte de núcleo se puede separar adicionalmente en 4 filamentos, en los que un único filamento está constituido por 8 haces (2° nivel jerárquico). Uno de estos haces se puede dividir adicionalmente en 24 hilos torcidos (3er nivel jerárquico), consistiendo cada uno en 6 fibras de seda individuales (4° nivel jerárquico). Este injerto con múltiples filamentos tiene un diámetro de 5,8 mm. En la presente invención, se muestra la eliminación de sericina a partir de un armazón tridimensional que tiene por objeto utilizarse como ligamento cruzado anterior de alto orden jerárquico (es decir, al menos dos niveles de jerarquía geométrica). El desgomado de esta compleja estructura no era posible en el caso del carbonato de sodio utilizado común pero con la solución de tampón borato según la presente invención podría lograrse.

Además, un producto tridimensional de seda preferente según la presente invención tiene una relación tridimensional en la que la dimensión más pequeña no es inferior a 1/100 de la dimensión más grande, preferentemente no inferior a 1/50 de la dimensión más grande, especialmente no inferior a 1/20 de la dimensión más grande. En realizaciones preferentes (p. ej., para los ligamentos cruzados anteriores), las dos dimensiones más pequeñas pueden encontrarse incluso en intervalos comparables, p. ej., tener una relación de 1:1 a 1:5 (véase, p. ej., las Figs. 7 y 10).

En contraste con el armazón utilizado en la presente invención, las estructuras de seda que se han producido previamente de fibras de seda cruda y posteriormente se han sometido a un procedimiento de desgomado, son de estructuras simples, principalmente mallas lisas (véase a continuación).

El armazón utilizado en el estudio de Chen y col., 2008 consiste en 12 hilos de punto por urdimbre en los que un hilo está construido por una única fibra de seda (un nivel jerárquico). Del mismo modo, las mallas utilizadas en los estudios de Liu y col., 2008 y Fan y col., 2008 están fabricadas de hilos en los que cada hilo consiste en un máximo de 80 fibras de seda individuales. Por ende, estas mallas muestran sólo un nivel jerárquico y por lo tanto son estructuras fibrosas más bien flojas que son altamente accesibles para el desgomado de soluciones. Además, estas mallas lisas se describen por tener un espesor medio en el estado exento de sericina de aproximadamente 0,325 +/- 0,116 mm, que es solamente 1/10 del armazón normalmente proporcionado por la presente invención para un ligamento cruzado anterior como se presenta en la sección de ejemplos de la presente invención. En el campo de la ingeniería de ligamentos y tisular de tendones con seda como el biomaterial, se ha desarrollado mucho trabajo de investigación en el pasado reciente (revisado en: Vepari y col., *Prog. Polym. Sci.* 32 (2007), 991-1007). Tomados en conjunto, sus valores de estructura fibrosa floja y espesor inferiores a 0,5 mm permiten el desgomado con agentes comunes similares a carbonato de sodio. Estas diferencias también se pueden ver en las Figs. 11A y 11B en comparación con, p. ej., las Figs. 1, 7 o 10).

La eficacia de la eliminación de sericina por el procedimiento según la presente invención se demostró por la pérdida de peso, ácido pícrico y tinción con carmín y microscopía electrónica de barrido. Además, la viabilidad y la proliferación celular de los fibroblastos del ligamento cruzado anterior (FLCA) y las células del estroma derivadas de tejido adiposo (CEA) en contacto con el medio con sedas se examinaron utilizando el ensayo MTT y el ensayo BrdU-Elisa, respectivamente.

Una "fibra de seda nativa", según la presente invención, es cualquier fibra de seda natural que comprende sericina. Una "fibra de seda nativa" tiene una estructura de fibroína intacta. En contraste con esto, una "fibra de seda regenerada" es una fibra de seda que ha sido recientemente creada a partir de una solución/suspensión de fibroína por procedimientos de hilado o procedimientos artificiales relacionados para la creación de fibras de seda artificial. Una fibra de seda nativa puede ser tomada de los capullos y tratada físicamente para obtener la fibra de seda (por lo general, los capullos se disuelven en agua hirviendo con el fin de obtener fibras largas individuales que se van a extraer e introducir en un carrete giratorio, sin embargo, no se aplican etapas químicas sobre una "fibra de seda nativa" que afecta a la estructura de fibroína de la fibra de seda obtenida a partir de la fuente natural).

En consecuencia, cualquier fibra de seda a partir de fuentes naturales que comprenden sericina puede someterse al procedimiento según la presente invención. La principal fuente industrial para tales fibras es, por supuesto, el gusano de seda de morera *Bombyx mori,* sin embargo, las fibras de seda de otros gusanos de seda (*Lepidopteron*) también se pueden utilizar en el procedimiento según la presente invención. Los gusanos de seda se pueden distinguir generalmente gusanos de seda de morera (*Bombyx mori*, *Bombyx mandarina*) y no 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 modelo de composición de aminoácidos de la sericina extraída entre los gusanos de seda silvestres y gusanos de seda domesticados es al menos un 97 %, lo que demuestra el alto número de secuencias de aminoácidos conservadas entre diferentes especies de gusanos de seda (Mondal y col., Caspian *J. Env. Sci.* 5 (2007), 63-76). La sericina puede eliminarse con éxito de las fibras de seda nativa independientes de las especies de gusanos de seda. Otras fuentes de seda natural posibles proceden de otros insectos además de gusanos de seda, tales como hormigas, polillas, pulgas, moscas de sierra, mantis, etc.

Preferentemente, la etapa de desgomado se realiza poniendo en contacto el producto de seda formado con un tampón borato que comprende iones borato, especialmente borato de sodio, ácido bórico e iones carbonato, especialmente carbonato de sodio.

Según una realización preferente de la presente invención, una etapa de purificación se realiza antes de la etapa de desgomado con etanol en una solución acuosa que contiene 1 a 98 % (p/p) de etanol, preferentemente 60 a 80 % (p/p) de etanol, especialmente 65 a 75 % (p/p) de etanol.

Preferentemente, el borato se utiliza en la etapa de desgomado en una solución acuosa que contiene borato 10 a 2.000 mM, preferentemente borato 50 a 1.000 mM, especialmente borato 100 a 1.000 mM. Preferentemente, el tampón borato tiene un pH de 7 a 11, preferentemente de 8 a 10, especialmente de 8,5 a 9,5. Al definir el pH para una configuración dada, debe tenerse cuidado de que se establezcan la combinación de pH, la concentración de los componentes del tampón y la temperatura/duración que impiden la destrucción sustancial de las estructuras de fibroína en el producto. Preferentemente, la etapa de purificación con etanol y la etapa de desgomado se llevan a cabo a temperaturas elevadas, preferentemente de 60 a 100 ºC, preferentemente de 80 a 100 ºC, especialmente de 90 a 100 ºC. La etapa de purificación con etanol y la etapa de desgomado se llevan a cabo preferentemente durante un periodo de tiempo de 30 min o más, preferentemente 60 min o más, especialmente 90 min o más. No hay límite superior técnico para estos tratamientos, desde perspectivas económicas, duraciones de 48 h o más, 24 h o más, o incluso 10 h o más, son menos preferentes, puesto que el desgomado ya se ha completado antes.

La presente invención permite ahora todas las etapas de producción para la creación de productos complejos de seda que son posibles para la fibra de seda natural. El riesgo de fisura y rotura de la fibra de seda o el producto de seda disminuyen significativamente con el procedimiento según la presente invención.

En consecuencia, todas las técnicas conocidas para el desarrollo de estructuras tridimensionales con fibras de seda nativa se pueden realizar con la presente invención. Preferentemente, la formación de un producto tridimensional de seda se realiza mediante tejido, trenzado, tricotado o prensado.

Es posible realizar el procedimiento según la presente invención con cualquier fibra de seda nativa; sin embargo, el procedimiento se ha optimizado específicamente para fibras de seda procedentes del gusano de seda *Bombyx mori.* Esto es también la principal fuente industrial de fibras de seda nativa para la industria textil. Sin embargo, también se pueden utilizar otras fibras de seda que contienen sericina para la producción de los productos de seda según la presente invención.

La mayoría de las fibras de seda nativa preferentes son aquellas procedentes del capullo del gusano de seda *Bombyx mori*. Las fibras de seda correspondientes al gusano de seda *Bombyx mori* tienen una sección transversal triangular con esquinas redondeadas, con una anchura de 5-10 µm. La cadena pesada de fibroína está compuesta principalmente de láminas beta, debido a una secuencia repetitiva de aminoácidos 59 mer con algunas variaciones. Las superficies planas de las fibrillas reflejan la luz en muchos ángulos, proporcionando a la seda un brillo natural.

La sección transversal de otros gusanos de seda puede variar en forma y diámetro: similar a una medialuna para Anaphe y cuña alargada para silvestre. Las fibras de gusano de seda se extruyen de forma natural a partir de dos glándulas de gusano de seda como un par de filamentos primarios (brin), que están pegados entre sí con proteínas de sericina que actúan como pegamento, para formar una baba. Los diámetros de la baba para la seda silvestre pueden alcanzar 65 µm.

Como ya se ha indicado anteriormente, cualquier producto tridimensional de seda puede ser procesado según la presente invención. Preferentemente, los productos son fabricados con el presente procedimiento que se utiliza en cirugía humana y veterinaria (siendo preferida la cirugía humana debido a la posibilidad de proporcionar productos para implantes médicos de seda farmacéuticamente aplicables con la presente invención), p. ej., una prótesis endovascular, un conducto nervioso, una malla para hernia, una ligadura, especialmente un ligamento cruzado anterior (LCA), o armazones para cartílago y hueso.

Por otra parte, el procedimiento según la presente invención se puede utilizar para producir material de cultivo de células, p. ej., un sustrato de cultivo celular tras el cual las células se pueden sembrar para un mayor cultivo o producción de componentes celulares (p. ej., proteínas recombinantes u otras sustancias que son secretadas fuera de las células).

El procedimiento según la presente invención puede ser fácilmente optimizado dependiendo de la naturaleza misma del producto tridimensional o la naturaleza de la seda nativa, así como del procedimiento de desgomado específico.

Según una realización preferente, el procedimiento según la presente invención emplea una etapa de desgomado que se lleva a cabo a una temperatura de 20 y 100 ºC, preferentemente 70 a 100 ºC, especialmente a temperatura de ebullición (p. ej., aproximadamente 100 ºC).

El procedimiento desvelado también se puede utilizar para la producción de productos bidimensionales de seda. En comparación con los procedimientos de la técnica anterior para la producción de un producto bidimensional de seda (Freddi y col., 2003), se desvela un procedimiento superior para el desgomado de estructuras bidimensionales de seda nativa fabricadas de fibras de seda nativa. Por lo tanto, también se desvela un procedimiento de producción de productos bidimensionales de seda, en el que las fibras de seda nativa se forman en un producto bidimensional de seda y el producto de seda formado se somete a una etapa de desgomado en la que el producto de seda formado se pone en contacto en primer lugar preferentemente con un tampón etanol acuoso y posteriormente se somete a una etapa de desgomado según la presente invención en la que se utiliza un tampón borato como agente de desgomado.

Otro aspecto de la presente invención se refiere a un producto tridimensional de seda, que puede obtenerse por un procedimiento según la presente invención. El producto obtenible según la presente invención tiene excelentes estabilidades mecánicas, es biocompatible, especialmente libre de reacciones adversas debido a la sericina, es biodegradable y tiene una enorme flexibilidad morfológica. En contraste con otros procedimientos de desgomado, la presente invención da lugar a productos en los que las propiedades mecánicas del producto final no disminuyen hasta tal punto, en contraste, las estabilidades mecánicas (p. ej., resistencia a la tracción, etc.) son comparables a las del producto de seda nativa y no disminuyen como en un producto de desgomado con álcali.

El producto tridimensional de seda según la presente invención puede ser una armazón de matriz, preferentemente para la fijación, la propagación, el crecimiento y la diferenciación celular. Los productos preferentes según la presente invención son implantes médicos, preferentemente una prótesis endovascular, un conducto nervioso, una malla para hernia, o una ligadura, especialmente un ligamento cruzado anterior (LCA). La manipulación de la producción de estos productos es significativamente ventajosa según la presente invención, debido a que el producto se forma mientras aún está presente la sericina en la fibra de la seda.

Los productos según la presente invención difieren significativamente de los productos según la técnica anterior, ya que los presentes productos son productos tridimensionales reales que no se componen de productos mono o bidimensionales desgomados llevados a una forma determinada por el manejo mecanicista. Por lo tanto, los presentes productos tienen también una estructura interna que difiere significativamente de p. ej., los productos de, p. ej., Fan y col. 2008 o 2009.

Se desvela asimismo un producto bidimensional de seda que puede obtenerse por un procedimiento desvelado.

Preferentemente, este producto es un producto con forma laminar, preferentemente para uso médico, especialmente una película, una membrana, una lámina tejida o una malla para la fijación, la propagación, el crecimiento y la diferenciación celular.

La presente invención se ilustra adicionalmente por medio de los siguientes ejemplos y los dibujos, pero sin quedar limitado a los mismos.

La Fig. 1 muestra el esquema de la jerarquía del armazón de seda. Los números indican la ubicación de muestreo de las fibras de seda para su posterior análisis: 1) revestimiento exterior, 2) revestimiento interior, 3) fibras de haz exterior y 4) haz interior.

La Fig. 2 muestra la pérdida de peso de los armazones de seda como consecuencia de A: muestras de seda hervidas en etanol al 70 %, B: muestras de seda hervidas en etanol al 70 % y desgomado con Na_2CO_3 realizado y C: muestras de seda hervidas en etanol al 70 % y desgomado con tampón borato realizado. Todos los datos son medias de 8 experimentos independientes ± D.E., *** indica una diferencia significativa con P <0,001.

La Fig. 3 muestra valores de ETM de armazones de seda desgomada de forma diferente del diseño de cable de acero. Los armazones de seda desgomada sirvieron como control. Los armazones de seda se desgomaron con soluciones alcalinas basadas en tampón borato o carbonato de sodio (Na_2CO_3). Las alturas de columna corresponden a las medias de al menos 7 valores, barras de error con respecto a la D.E. *** indica diferencias significativas con el grupo control, * indica una diferencia significativa de P <0,05.

La Fig. 4 muestra valores de rigidez de armazones de seda desgomada de forma diferente del diseño de alambre de acero. Los armazones de seda desgomada sirven como control. Los armazones de seda se desgomaron con soluciones alcalinas basadas en tampón borato o con carbonato de sodio (Na_2CO_3). Las alturas de columna corresponden a las medias de al menos 7 valores y las barras de error con respecto a la D.E.

La Fig. 5 muestra micrografías electrónicas de barrido de los armazones de seda desgomada de forma diferente. Cruda) fibras de seda cruda no tratada, en su estado nativo. EtOH) seda tratada con etanol; Na_2CO_3 0,01 M) seda desgomada con Na_2CO_3, utilizando 1,1 g/l de solución de carbonato de sodio; Na_2CO_3 0,02 M) seda desgomada con Na_2CO_3, utilizando 2,1 g/l de solución de carbonato de sodio; y borato) seda desgomada con tampón borato, utilizando ácido bórico 0,2 M en un tampón borato de sodio 0,05 M a pH = 9,0 seleccionado entre diferentes orígenes jerárquicos; fibras de revestimiento exterior, fibras de revestimiento interior, fibras de haz exterior y fibras de haz interior. Todas las imágenes fueron obtenidas con un aumento de 500x.

La Fig. 6 muestra la tinción con ácido pícrico y carmín de crudo) armazón de seda cruda no desgomada, Na_2CO_3) armazón de seda desgomada con carbonato de sodio y borato) armazón de seda desgomada con tampón borato. En cada imagen de izquierda a derecha: exterior del revestimiento, interior del revestimiento, haces orientados al exterior y al interior de la construcción del armazón.

La Fig. 7 muestra el análisis MTT de los fibroblastos del ligamento cruzado anterior (FLCA) y las células del estroma derivadas de tejido adiposo (CEA) cultivadas con diferentes medios de extracción. Control, Na_2CO_3 y tampón borato corresponden a los medios que se han utilizado para sumergir los armazones de seda tratados de manera diferente durante 24 h en una incubadora humidificada a 37 ºC en 5 % de CO_2, respectivamente. Todos los datos son medias de 8 experimentos independientes ± D.E.

La Fig. 8 muestra el análisis BrdU de los fibroblastos del ligamento cruzado anterior (FLCA) y las células del estroma derivadas de tejido adiposo (CEA) cultivadas con diferentes medios de extracción. Control, Na_2CO_3 y tampón borato corresponden a los medios que se han utilizado para sumergir los armazones de seda tratados de manera diferente durante 24 h en una incubadora humidificada a 37 ºC en 5 % de CO_2, respectivamente. Todos los datos son medias de 8 experimentos independientes ± D.E.

La Fig. 9 muestra la viabilidad de células del estroma derivadas de tejido adiposo (CEA) en haces de fibras internas desgomados con tampón borato visualizados por tinción con células vivas utilizando calceína AM (verde). Azul) es una imagen de fluorescencia del canal azul que muestra autofluorescencia de las fibras de fibroína de seda. Azul/verde indica una superposición de la imagen de la autofluorescencia de la seda (azul) en las células teñidas con calceína AM (verde).

La Fig. 10 muestra la eliminación de sericina determinada a través de tinción con ácido pícrico y carmín (A-D). Tinción con ácido pícrico y carmín del armazón de seda cruda desgomada (cruda), armazón de seda desgomada con carbonato de sodio (Na_2CO_3) y armazón de seda desgomada con tampón borato (borato) del revestimiento, haces orientados al exterior y al interior de la construcción del armazón. B) muestra los valores absolutos de "enrojecimiento" calculado a partir de los valores RVA de las imágenes utilizando el software Definiens XD 1.0. enrojecimiento = (2x rojo - verde - azul)/(2x rojo + verde + azul). Las barras de escala indican 5 mm.

La Fig. 11 muestra las mallas de seda con sólo un nivel de jerarquía geométrica como se desvela en Chen y col., 2008. (11A; imagen por MEB del armazón de seda tejido; el tamaño de poro fue de aproximadamente 1x1 mm) y Liu y col., 2008 (11B imagen por MEB del armazón de seda tejido, barra de escala = 200 µm).

Ejemplos

Materiales y procedimientos

Materiales

Si no se indica lo contrario, todos los reactivos fueron adquiridos en Sigma (Viena, Austria) y tuvieron calidad analítica.

Diseño de la matriz de seda

Las fibras blancas crudas de gusanos de seda *Bombyx mori* de 20/22 den, 250 T/m, se adquirieron de Testex AG (Zúrich, Suiza). Los armazones trenzados se produjeron a continuación en cooperación con Edelrid (Edelrid GmbH, Isny im Allgäu, Alemania). El armazón trenzado exhibe un diseño de alambre de acero y se puede subdividir en un componente de cubierta y núcleo. Ambos elementos de revestimiento y de núcleo tienen una estructura jerárquica compuesta de hebras, haces, hilos torcidos y fibras de seda individuales (véase la Fig. 1). La unidad básica de las estructuras de trenzado representa un hilo torcido que está formado por seis fibras de seda individuales. Seis y veinticuatro hilos torcidos son la base estructural para el revestimiento y una hebra, respectivamente. Los

armazones enteros consisten en el componente de núcleo (cuatro hebras) envuelto por el revestimiento tubular, lo que resulta en un diámetro total de 5,8 mm. La estructura tubular de la cubierta y las hebras del núcleo están fabricadas con la ayuda de una máquina de trenzado comercial con fibras en cada una de las dieciséis bobinas. La densidad de trenzado de los revestimientos y los haces de núcleo asciende a 10 y 25 cruces/pulgada francesa, respectivamente. Una pulgada francesa corresponde a 27,072 mm.

Etapa de purificación con etanol

Con el fin de limpiar los armazones fabricados de seda cruda de *Bombyx mori* de sustancias procedentes del procedimiento de preparación, tales como agentes de apresto o sustancias inherentes en la seda cruda tales como ceras, se realizó una etapa de lavado con etanol al 70 %. Por lo tanto, los armazones se sumergieron en etanol al 70 % en un matraz de fondo redondo y se prepararon a reflujo durante 2 veces, de manera discontinua.

Desgomado

Dos soluciones de desgomado diferentes se utilizaron durante todo el estudio para preparar muestras para el análisis; (i) Na_2CO_3 0,02 M y (ii) ácido bórico 0,2 M en un tampón borato de sodio 0,05 M a pH = 9,0 (Jiang y col., 2006). Para el análisis por microscopía electrónica de barrido, un grupo de muestras se desgomó con Na_2CO_3 0,01 M. El procedimiento de desgomado procedió según se indica: armazones largos de 8 cm se colocaron en un vaso de precipitados de 1.000 ml, se añadieron 500 ml de solución de desgomado, el vaso de precipitados se cerró herméticamente con papel de aluminio y se calentó en un agitador magnético común que incluye una placa calefactora hasta que las soluciones de desgomado empezaron a hervir. Después de 45 min, la solución de desgomado se renovó y la etapa de ebullición se repitió. Después del desgomado, las muestras se lavaron a fondo en ddH_2O. Finalmente, todas las muestras se secaron al aire antes de llevarse a cabo el ensayo adicional.

Pérdida de peso

La eficacia de cada procedimiento de desgomado se evaluó cuantitativamente mediante la medición de una pérdida de peso. La pérdida de peso se expresa como un porcentaje del peso inicial y los pesos se registraron hasta ponderaciones sucesivas establecidas en 0,1 mg.

Muestreo de las fibras de seda

Utilizando una tinción de picrocarmín y análisis por MEB, se verificó la eficacia del desgomado dependiente de la ubicación. Se muestrearon las fibras de seda de diferentes lugares dentro del armazón diseñado con cable de acero (Fig. 1).

Tinción con picrocarmín

La tinción con picrocarmín es un procedimiento de tinción clásica para secciones tisulares y se lleva a cabo por la mezcla de soluciones de carmín y ácido pícrico. Según un procedimiento descrito por Wang y col. (Wang y col., 2011), esta tinción se utilizó como procedimiento de evaluación cualitativa del efecto de desgomado de la seda. En resumen, una solución de tinción se efectúa mezclando carmín disuelto en 25 % de amoniaco con una solución acuosa saturada de ácido pícrico y ajustando el pH a 8,0-9,0. Para la tinción de las fibras de seda, las matrices se sumergen dentro de la solución de tinción en tubos de ensayo separados y se calientan a continuación en un baño de agua hirviendo durante 5 min. Posteriormente, las muestras se lavaron a fondo con ddH_2O y se secaron a temperatura ambiente. Las imágenes digitales de las matrices de seda teñida se obtuvieron utilizando una cámara digital (Ixus 100S, Canon, Japón). Estas imágenes se han utilizado para calcular los valores respectivos de "enrojecimiento" utilizando el software Definiens XD 1.0 (Definiens AG, Alemania, Múnich) en base a la siguiente fórmula de cálculo: Enrojecimiento = (2x rojo - verde - azul)/(2x rojo + verde + azul).

Análisis por microscopía electrónica de barrido (MEB)

Tras el procedimiento de desgomado, los armazones se enjuagaron inmediatamente con solución salina tamponada con fosfato (pH 7,4) y se fijaron en 2,5 % de glutaraldehído durante la noche a temperatura ambiente. Las muestras se deshidrataron posteriormente a través de etanoles graduados seguido de hexametildisilazano, y se dejaron secar al aire en una campana extractora. Las muestras fueron recubiertas por pulverización catódica con Pd-Au utilizando un dispositivo de recubrimiento por pulverización catódica Polaron SC7620 (Quorum Technologies Ltd. East Grinstead, Reino Unido) y se examinaron con un microscopio electrónico de barrido JEOL JSM-6510 (JEOL GmbH, Eching/Múnich, Alemania) a 3 kV.

Ensayo mecánico

Los armazones de seda se sometieron a ensayos de tensión utilizando una máquina de ensayo de materiales Zwick Z050 (Zwick GmbH & Co. KG, Ulm, Alemania). Para garantizar una fijación estable dentro de la máquina de ensayo, los extremos de los armazones fueron embebidos en resina epoxi (resina epoxi BK, VOSSCHEMIE GmbH, Uetersen, Alemania). Antes del ensayo, los armazones se incubaron en TFS durante al menos 24 h. Las muestras se tiraron hasta romperse a una velocidad de deformación de 10 mm/min a 23 ± 2 ºC y una humedad relativa de 45-

65 %. Los ensayos de tirar hasta romper se realizaron con 50 N de pretensión. La carga más alta alcanzada antes de la rotura se tomó como el esfuerzo de tracción máximo (ETM). Para calcular los valores de rigidez, se utilizó la porción lineal de la curva de tensión/deformación.

Cultivo celular

Fibroblastos del ligamento cruzado anterior (FLCA)

La junta de revisión ética de la AUVA (IRB) aprobó el procedimiento de recogida del tejido de LCA de pacientes sometidos a una reconstrucción total del LCA. Los fibroblastos del ligamento cruzado anterior (FLCAs) se obtuvieron por un procedimiento modificado basado en un protocolo de Nagineni y col. (Nagineni, Amiel, Green, Berchuck, y Akeson, 1992). En resumen, se recogió el tejido de LCA y se picó asépticamente en pequeñas piezas de 1-3 mm^3. Luego, estos explantes se transfirieron a cajas de Petri de 100 mm para cultivo celular y se cultivaron en DMEM que contenía 10 % de SFB (PAA, Pasching, Austria), L-glutamina 2 mM, 100 U/ml de penicilina y 0,1 mg/ml de estreptomicina. La excrecencia celular de los explantes se controló hasta que se alcanzó un 90 % de confluencia, seguido de subcultivo de las células.

Células del estroma derivadas de tejido adiposo (CEA)

Se obtuvo tejido adiposo subcutáneo durante los procedimientos de liposucción de pacientes externos bajo anestesia tumescente local (consentimiento obtenido por parte de IRB). Como se ha descrito previamente (Wolbank y col., 2007), las células del estroma derivadas de tejido adiposo (CEA) se aislaron y se cultivaron en un medio que contiene DMEM-contenido bajo de glucosa/F-12 de HAM suplementado con 10 % de SBF (PAA, Pasching, Austria), L-glutamina 2 mM, y 1 ng/ml de factor de crecimiento de fibroblastos básico humano recombinante (rhFGF, R&D Systems, Minneapolis, EE.UU.)

Ensayo de viabilidad y proliferación celular

Para someter a ensayo la influencia de los armazones de seda desgomada de forma diferente sobre el comportamiento de viabilidad y proliferación celular, 1 g de seda desgomada se sumergió en 5 ml de medio de cultivo celular durante al menos 24 h a 37 ºC en un entorno de CO_2 al 5 %. En paralelo, las células fueron sembradas en placas de 24 pocillos con una densidad celular de $0{,}2x10^5$ células/pocillo. A continuación, respectivamente, se filtró el medio que contiene productos de lixiviación a partir del material de seda (0,22 µm, Rotilabo, Karlsruhe, Alemania) y se utilizó para el intercambio del medio en los cultivos celulares. Como control negativo, se utilizó un medio de cultivo convencional.

Proliferación

La proliferación se determinó utilizando un ensayo de captación de 5-bromo-2-desoxiuridina (BrdU) (kit de ensayo ELISA para proliferación celular, Cat. 1647229, Roche Diagnostics) según las instrucciones del fabricante. Brevemente, las células se cultivaron con el medio respectivo que contiene 100 µM de BrdU durante 12 h en una incubadora humidificada a 37 ºC y 5 % de CO_2. Se eliminó el medio y las placas de cultivo se secaron al aire durante 15 min. Se añadió una solución FixDenat® durante 30 min y posteriormente se incubó con anticuerpos anti-BrdU POD (peroxidasa) durante 60 min a temperatura ambiente. La placa se lavó tres veces con TFS y se añadió tetrametilbencidina durante 30 min como sustrato. La reacción se detuvo mediante la adición de H_2SO_4 1 M y la absorción se midió a 450 nm con 690 nm como longitud de onda de referencia.

Ensayo de viabilidad/citotoxicidad celular por el ensayo MTT

El medio de cultivo celular se aspiró y el medio de cultivo celular respectivo que contiene 650 mg/ml de MTT bromuro de [3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio] se añadió a cada pocillo. Las células se incubaron durante 1 h a 37 ºC en un entorno de CO_2 al 5 %. Se aspiró el medio y el precipitado formazán MTT se disolvió en DMSO mediante agitación mecánica en la oscuridad durante 20 min. Las alícuotas de 100 µl de cada muestra se transfirieron a placas de 96 pocillos. La absorbancia de luz a 550 nm se leyó inmediatamente en un lector automático de microplacas (Spectra Thermo, TECAN Austria GmbH, Austria). Los valores de densidad óptica (DO) se corrigieron para un fondo inespecífico.

Viabilidad celular en un armazón de seda desgomada con tampón borato

Para visualizar la viabilidad celular de las CEA en armazones de seda desgomada con tampón borato, un haz de fibra interior de la construcción entera con 1 cm de longitud se sembró con $1x10^6$ células/ml de suspensión celular durante 24 h a 37 ºC en un entorno de CO_2 al 5 %. Los materiales de armazón sembrados con células fueron teñidos con calceína-acetoxi-metiléster (calceína AM, Invitrogen, Lofer, Austria). Por lo tanto, las construcciones se incubaron durante 15 min en CM que contiene 5 mg/ml de calceína AM, y se lavaron con TFS. Después de lavarse de nuevo con TFS, las imágenes microscópicas de fluorescencia fueron tomadas empleando un microscopio de epifluorescencia Leica DMI6000B (Leica Microsystems GmbH, Wetzlar, Alemania).

Análisis estadístico

Todos los cálculos se realizaron utilizando el software GraphPad (GraphPad Software, Inc., La Jolla, CA, EE.UU.). La distribución normal de los datos se ensayó con el ensayo de Kolmogorov-Smirnov. ANOVA de una vía seguido por el ensayo post hoc de Tukey fue utilizada para llevar a cabo la significación estadística y los valores de P inferiores a 0,05 se consideraron estadísticamente significativos.

Resultados:

Pérdida de peso

Para confirmar la eficacia del desgomado basado en tampón borato en comparación con el procedimiento de desgomado clásico de Na_2CO_3, se determinó la pérdida de peso de los armazones de seda tratados. Antes de la eliminación de sericina, los armazones de seda se hirvieron en etanol al 70 % (p/p) para separar cualquier posible conservante textil. Este tratamiento con alcohol dio lugar a una pérdida de peso del armazón de seda de 2,9% ± 0,1 %. El siguiente procedimiento de desgomado con Na_2CO_3 o tampón borato dio como resultado, respectivamente, una pérdida de peso de 25,2 ± 0,3 % y 27,1 % ± 0,1 %.

Influencia del desgomado en las propiedades mecánicas de los armazones de seda de cable de acero

Los parámetros de tracción obtenidos a partir de ensayos de tirar hasta romper se resumen en la tabla 1. Complementariamente, la tabla también contiene valores de referencia, rigidez lineal (242 ± 28 N/mm) y ETM (2.160 ± 157 N) de un complejo fémur-LCA-tibia de ser humano de un estudio de Woo y col. (Woo, Hollis, Adams, Lyon, y Takai, 1991).

Tabla 1. Influencia del procedimiento de desgomado en las propiedades mecánicas de un armazón de seda de cable de acero y valores de referencia de un LCA de ser humano tomado de Woo y col. (Woo y col., 1991). Todos los datos son medias de al menos 7 experimentos independientes ± EEM.

matriz de seda	ETM [N]	Rigidez [N/mm]
Nativa, no desgomada	2.757 ± 42	270 ± 49
Desgomada con Na_2CO_3	2.230 ± 94	271 ± 34
Desgomada con tampón borato	2.440 ± 182	290 ± 29
LCA nativo	2.160 ± 157	242 ± 28

Esfuerzo de tracción máximo (ETM)

Ambos procedimientos empleados de desgomado causan una disminución significativa en los valores ETM en comparación con el control no desgomado (Fig. 3). Los armazones de seda no desgomada cruda, armazones de seda desgomada con tampón borato y armazones desgomados con carbonato de sodio mostraron valores ETM de 2.757 ± 42, 2.440 ± 182 y 2.230 ± 94, respectivamente. Estos valores corresponden al 89 % de ETM inicial antes de la eliminación de sericina para los armazones de seda desgomada con tampón borato y al 81 % de los armazones desgomados con carbonato de sodio. De este modo, el ETM para los armazones desgomados con tampón borato es significativamente más alto que el obtenido con el desgomado clásico con carbonato de sodio.

Rigidez

La rigidez de los armazones de seda, ya sea desgomada con carbonato de sodio o con tampón borato es bastante equivalente, oscila desde 271 ± 34 N/mm y 290 ± 29 N/mm, respectivamente, y no es estadísticamente diferente de los armazones de seda nativa no desgomada (270 ± 49).

Análisis por MEB

Para investigar la eficacia de la eliminación de sericina dependiente de la arquitectura 3D, las fibras de diferente origen jerárquico se han recogido y analizado visualmente utilizando MEB. La Figura 5 muestra la morfología de la superficie de estas fibras de seda. Obviamente, las fibras SF crudas no desgomadas exhiben un recubrimiento similar a una goma no uniforme de sericina que cubre los filamentos de fibroína de seda subyacentes (Fig. 5 cruda). Las fibras de seda en la Figura 5, fila "EtOH" se han hervido en etanol para deshacerse de sustancias lipoides, tales como conservantes de ingeniería textil. La fila 2 representa fibras SF crudas no desgomadas que han sido tratadas con alcohol. Aparentemente, no hay diferencia alguna entre las fibras SF tratadas con alcohol y no tratadas. Las micrografías de armazones SF desgomados por los procedimientos clásicos de Na_2CO_3 (Fig. 5 Na_2CO_3 0,01 M, Na_2CO_3 0,02 M) y por el procedimiento basado en tampón borato (Fig. 5 borato) muestran diferencias en la eliminación de sericina, especialmente en partes internas del armazón estructurado 3D. Los armazones desgomados con tampón borato (Fig. 5, borato) exhiben fibras SF exentas de sericina, sistemáticamente desde el revestimiento exterior a las fibras interiores.

Tinción con ácido pícrico y carmín

Aparte del análisis por MEB, la eliminación de sericina también fue confirmada por la tinción con ácido pícrico y carmín. Como se describe en Wang y col. (Wang y col., 2011), la fibroína y la sericina adsorben el carmín y el ácido pícrico de forma diferente. La sericina absorbe tanto carmín como ácido pícrico al mismo tiempo mientras que la fibroína adsorbe selectivamente moléculas de ácido pícrico. Por lo tanto, una coloración roja de la seda se puede atribuir a residuos de sericina. La Figura 3A muestra armazones de seda cruda no desgomada teñida intensamente de color rojo, revelando la existencia de cantidades sustanciales de sericina en la superficie de estas fibras de armazones. La Figura 3B y 3C representan los armazones de seda teñida desgomada con Na_2CO_3 y tampón borato, respectivamente. El armazón de seda desgomada con Na_2CO_3 muestra un color rojo escaso en el revestimiento y en los haces de fibras exteriores pero un color rojo intensificado en las fibras de haces interiores. En cambio, los armazones de seda desgomada con tampón borato exhiben un color blanco a amarillo indicando la eliminación con éxito de sericina, notable en las partes internas del armazón con estructura jerárquica 3D.

Para el análisis densitométrico, los diferentes armazones de colores han sido fotografiados y las imágenes resultantes (Fig. 10A, C, E) se han utilizado para calcular los valores de enrojecimiento de las diferentes muestras de armazones. En la Figura 10B, estos valores se muestran en un gráfico de barras que demuestra cuantitativamente las observaciones descritas anteriormente.

Viabilidad celular

Los resultados del ensayo por MTT para las células FLCA y CEA cultivadas en medio de lixiviación de los armazones de seda desgomada de forma diferente se presentan en la figura 7. En ambos tipos celulares, la viabilidad celular no difirió significativamente de la viabilidad del medio de cultivo celular convencional sin tratar, después de 24 h de cultivo.

Proliferación

Según los resultados de BrdU ELISA, no se detectaron diferencias significativas en la proliferación celular, ya sea para células FLCA o CEA (Fig. 8) cultivadas en los fluidos de extracto de seda desgomada de forma diferente o medio de cultivo convencional sin tratar después de 24 h de cultivo.

Siembra de las células en un armazón de seda desgomada con tampón borato

Para verificar la viabilidad celular de las CEA en las construcciones de seda desgomada con tampón borato, una tinción de células vivas con calceína AM se realizó en haces de fibras interiores sembradas con CEAs. La Figura 9 (verde) muestra células viables en las fibras de fibroína de seda. Una superposición de las imágenes del canal azul (Fig. 9 azul) en el canal verde (Fig. 9 verde) demuestra la unión de las CEA a lo largo del material de armazón con estructura de fibras (Fig. 9 azul/verde).

<u>Discusión</u>

Para utilizar armazones de fibras de seda en TE y aplicaciones de medicina regenerativa, la eliminación de sericina es esencial para garantizar la biocompatibilidad. Sin embargo, ningún estudio ha investigado la eliminación de sericina en armazones de seda con un alto orden jerárquico. Por lo tanto, la capacidad de desgomar armazones de seda prefabricados, que exhiben varios niveles de jerarquía geométrica con soluciones clásicas de Na_2CO_3 se investigó en comparación con un procedimiento de desgomado basado en tampón borato. El procedimiento convencional en TE es eliminar la goma de seda cruda antes de la fabricación del armazón. Sin embargo, la eliminación de sericina hace que la fibra de seda se desgaste y debilite su propiedad estructural, por lo que es muy difícil elaborar los textiles (p. ej., punto o trenzado) en los armazones para aplicaciones TE. Un procedimiento altamente intensivo en mano de obra para potenciar las características de procesamiento de fibras exentas de sericina fue propuesto por Liu y col. (Liu y col., 2007). En este estudio, la sericina se sustituye con reticulación química de fibras de seda libres de sericina con gelatina, que sirve como una superficie de deslizamiento y garantiza la procesabilidad en ingeniería textil. En otros estudios, los armazones de seda se han fabricado de antemano y un procedimiento de desgomado se realizó posteriormente (Fan y col., 2009) (Fan y col., 2008) (Chen y col., 2008). No obstante, las bases estructurales de todos estos estudios eran mallas lisas. En comparación con las estructuras jerárquicas de ingeniería textil de alto orden, son fácilmente penetradas por reactivos de desgomado.

Es bien sabido que el contenido de sericina en seda cruda de *Bombyx mori* representa aproximadamente un 25 % en peso. Las mediciones de pérdida de peso indicaron una eliminación más eficiente de sericina al utilizar soluciones de desgomado basadas en tampón borato (pérdida de peso 27,1 % ± 0,1 %) frente al procedimiento de desgomado comúnmente utilizado de Na_2CO_3 (25,2 ± 0,3 % de pérdida de peso). Estos resultados son soportados adicionalmente mediante un análisis por MEB que demuestra que las sedas desgomadas con Na_2CO_3 aún exhiben residuos de sericina, ubicados principalmente en las estructuras internas del armazón jerárquico. Por el contrario, la superficie de armazones de seda desgomada con tampón borato, era muy lisa y limpia, independientemente de la ubicación de muestreo. La tinción con ácido pícrico y carmín corroboraron los resultados del análisis por MEB mediante la presentación de los residuos de sericina como áreas de color rojo en las sedas tratadas con Na_2CO_3, especialmente en las fibras de la estructura interior. Los resultados obtenidos por las mediciones de pérdida de

peso, el análisis por MEB y tinción PACS demostraron la eliminación eficaz de sericina con desgomado basado en tampón borato.

Para analizar el efecto de desgomado en las propiedades mecánicas de las estructuras de seda, se realizaron ensayos de tirar hasta romper con armazones de seda desgomada y no desgomada de diseño de cable de acero. La disminución de la resistencia mecánica de las sedas (EMT) después del desgomado es coherente con la literatura previa (Liu y col., 2007) (Wang y col., 2011). Curiosamente, los valores de ETM fueron significativamente mayores en el tampón borato en comparación con el grupo de desgomado con carbonato de sodio. Estos resultados están en conformidad con los hallazgos de un estudio realizado por Jiang y col. (Jiang y col., 2006). En ese trabajo, los parámetros de tracción de las fibras individuales de seda desgomada de manera diferente se determinaron con el resultado de que el tampón borato es el reactivo de desgomado superior en comparación con carbonato de sodio en la preservación de las propiedades mecánicas inherentes de las fibras de seda.

Las fibras de seda individuales exhiben propiedades elásticas inferiores después de la eliminación de sericina. Sorprendentemente, en la presente invención, los valores de rigidez no difirieron significativamente entre los armazones de seda desgomada o no desgomada. Estos resultados son inconsistentes con la expectativa inicial de que la rigidez del armazón después del desgomado disminuiría. Una posible explicación para estos hallazgos opuestos podría ser que la mayoría de las propiedades de rigidez de un armazón de ingeniería textil se atribuyen más bien a su arquitectura jerárquica que a las características mecánicas de las fibras individuales. Esta explicación está apoyada por un estudio (Horan y col., 2006) en el que se demostró la potencia para ajustar el ETM y la rigidez de los armazones de seda fabricados por la elección de diversos procedimientos textiles.

Para obtener una perspectiva de las diferencias de biocompatibilidad *in vitro* entre los armazones de seda desgomada de forma diferente en combinación con células estromales derivadas de tejido adiposo (CEA) y células de fibroblastos del ligamento cruzado anterior (FLCA), (ambos tipos de células tienen por objeto utilizarse en futuros enfoques de ligamento TE), se llevaron a cabo ensayos de viabilidad y proliferación celular. En ambos ensayos, se ensayó si el extracto fluido de fibroína de seda tuvo efectos negativos sobre la viabilidad celular y la proliferación celular. Los resultados del ensayo MTT sugirieron que, independientemente de la solución de desgomado utilizada, los extractos fluidos de sedas no tienen efectos citotóxicos sobre los tipos de células investigadas. El análisis de la proliferación celular por medio de la incorporación de BrdU no reveló alteraciones en ambos grupos de desgomado. Además, la viabilidad celular de CEA en la seda desgomada con tampón de borato se demostró a través de la tinción con calceína AM.

A pesar de los prometedores resultados *in vitro*, ensayos *in vivo* adicionales tienen que ser llevados a cabo para investigar los efectos del desgomado con tampón borato en el comportamiento *in vivo*, especialmente con respecto a la tasa de degradación.

Conclusión

Estos resultados muestran que el desgomado de los armazones 3D jerárquicos altamente ordenados que no es posible con las soluciones clásicas de desgomado con carbonato de sodio se puede lograr a través de un sistema basado en tampón borato, preferentemente junto con una etapa de lavado con etanol. Mientras se preserva esencialmente la integridad mecánica de los armazones de seda, se descubrió que el tampón borato era adecuado para eliminar completamente la sericina provocada por la respuesta inmunitaria, incluso en estructuras interiores del armazón ensayado de seda. La posibilidad de eliminar la sericina adecuadamente después del procedimiento de ingeniería textil facilita la producción de estructuras de armazón altamente ordenadas. Este hallazgo puede fomentar el uso de la seda como material de armazón en futuras aplicaciones de medicina regenerativa y TE, que están en necesidad de estructuras jerárquicas sofisticadas y complejas.

REIVINDICACIONES

1. Procedimiento de producción de productos para implantes médicos tridimensionales de seda con más de un nivel de jerarquía geométrica, en el que las fibras de seda nativa se forman en un producto para implante médico tridimensional de seda y el producto de seda formado es sometido durante al menos 30 min a una etapa de desgomado, en el que un tampón borato se utiliza como agente de desgomado y en el que el producto de seda formado se pone en contacto con un tampón etanol acuoso antes de la etapa de desgomado, y en el que el producto para implantes médicos de seda tiene un contenido de sericina inferior a 0,1 % (p/p) y un espesor de al menos 0,5 mm.

2. Procedimiento según la reivindicación 1, en el que la etapa de desgomado se realiza poniendo en contacto el producto de seda formado con un tampón borato que comprende iones borato, especialmente borato de sodio, ácido bórico e iones carbonato, especialmente, carbonato de sodio.

3. Procedimiento según la reivindicación 1 o 2, en el que el etanol se utiliza en una solución acuosa que contiene 1 a 98 % (v/v) de etanol, preferentemente 60 a 80 % (v/v) de etanol, especialmente 65 a 75 % (v/v) de etanol.

4. Procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en el que el borato se utiliza en una solución acuosa que contiene borato 10 a 2.000 mM, preferentemente borato 50 a 1.000 mM, especialmente borato 100 a 1.000 mM.

5. Procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en el que la formación de un producto tridimensional de seda se realiza por tejido, trenzado, tricotado o prensado.

6. Procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en el que las fibras de seda nativa son fibras procedentes de un capullo de gusanos de seda (*Bombyx mori*).

7. Procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en el que el producto para implante médico de seda formado es una prótesis endovascular, un conducto nervioso, una malla para hernia, una ligadura, armazones para tendón, tráquea o bronquios, especialmente, un ligamento cruzado anterior (LCA) o armazones para cartílago y hueso.

8. Procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, en el que el producto de seda formado es un sustrato celular.

9. Procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, en el que la etapa de desgomado se lleva a cabo a una temperatura de 20 y 100 ºC, preferentemente 70 a 100 ºC, especialmente a temperatura de ebullición.

10. Producto de seda tridimensional, que puede obtenerse por un procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9.

11. Producto de seda tridimensional según la reivindicación 10, en el que el producto es un armazón de matriz, preferentemente para la fijación, la propagación, el crecimiento y la diferenciación celular.

12. Producto de seda tridimensional según la reivindicación 10 u 11, en el que la dimensión más pequeña no es inferior a 1/100 de la dimensión más grande, preferentemente no inferior a 1/50 de la dimensión más grande, especialmente no inferior a 1/20 de la dimensión más grande.

13. Producto de seda tridimensional según una cualquiera de las reivindicaciones 10 a 12, en el que las dos dimensiones más pequeñas tienen una relación de 1:1 a 1:5.

14. Producto de seda tridimensional según una cualquiera de las reivindicaciones 10 a 13, en el que el diámetro del producto en la dimensión más pequeña es al menos de 1,0 mm, preferentemente al menos 2,0 mm, especialmente al menos 5,0 mm.

Fig.1

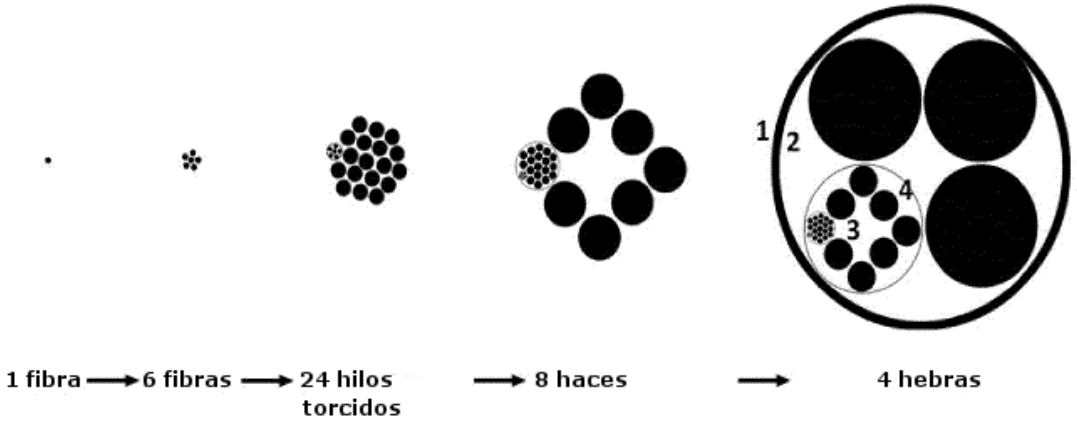

1
2
3
4
1 fibra
6 fibras
24 hilos torcidos
8 haces
4 hebras

Fig.2

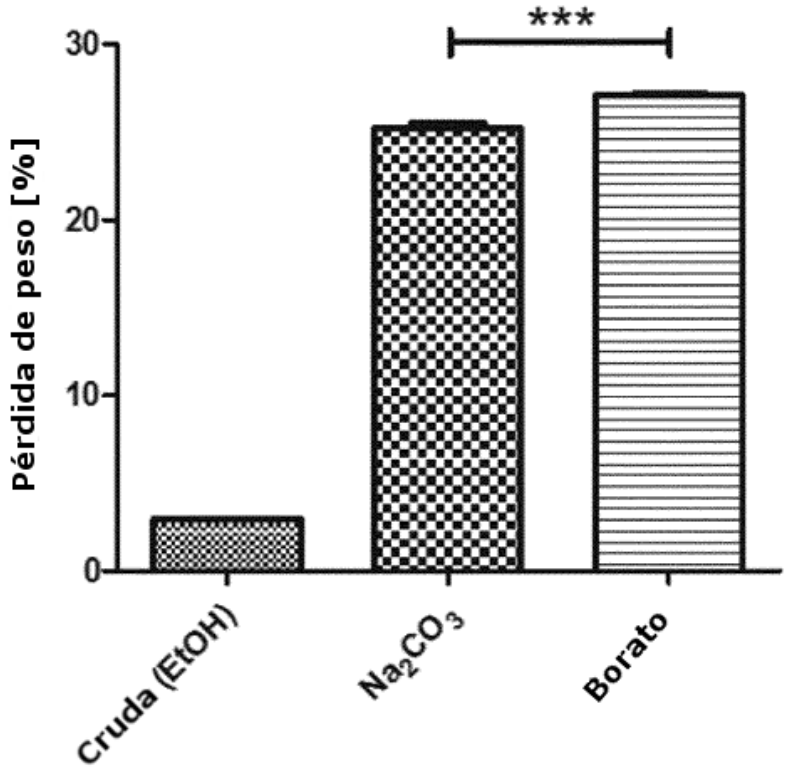
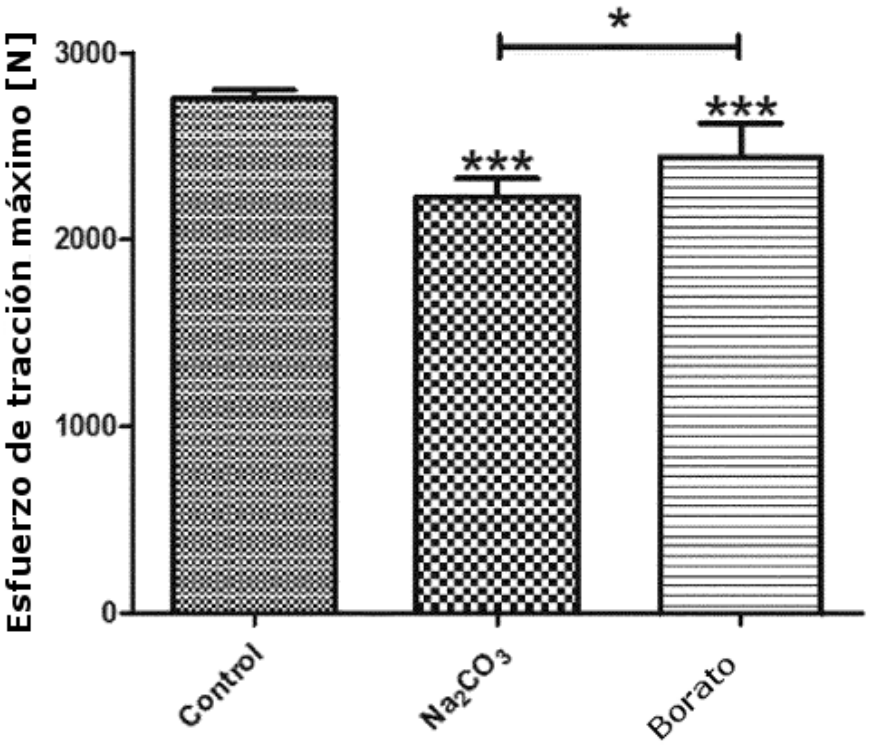

***
30
20
10
0
Pérdida de peso [%]
Cruda (EtOH)
Na_2CO_3
Borato

Fig. 3


Esfuerzo de tracción máximo [N]
3000
2000
1000
0
*
***
***
Control
Na_2CO_3
Borato

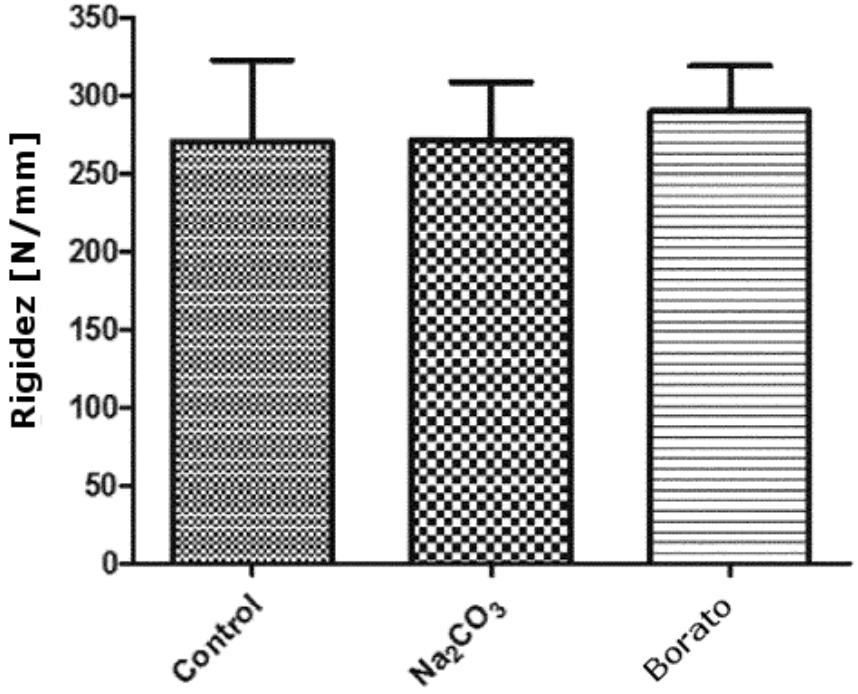
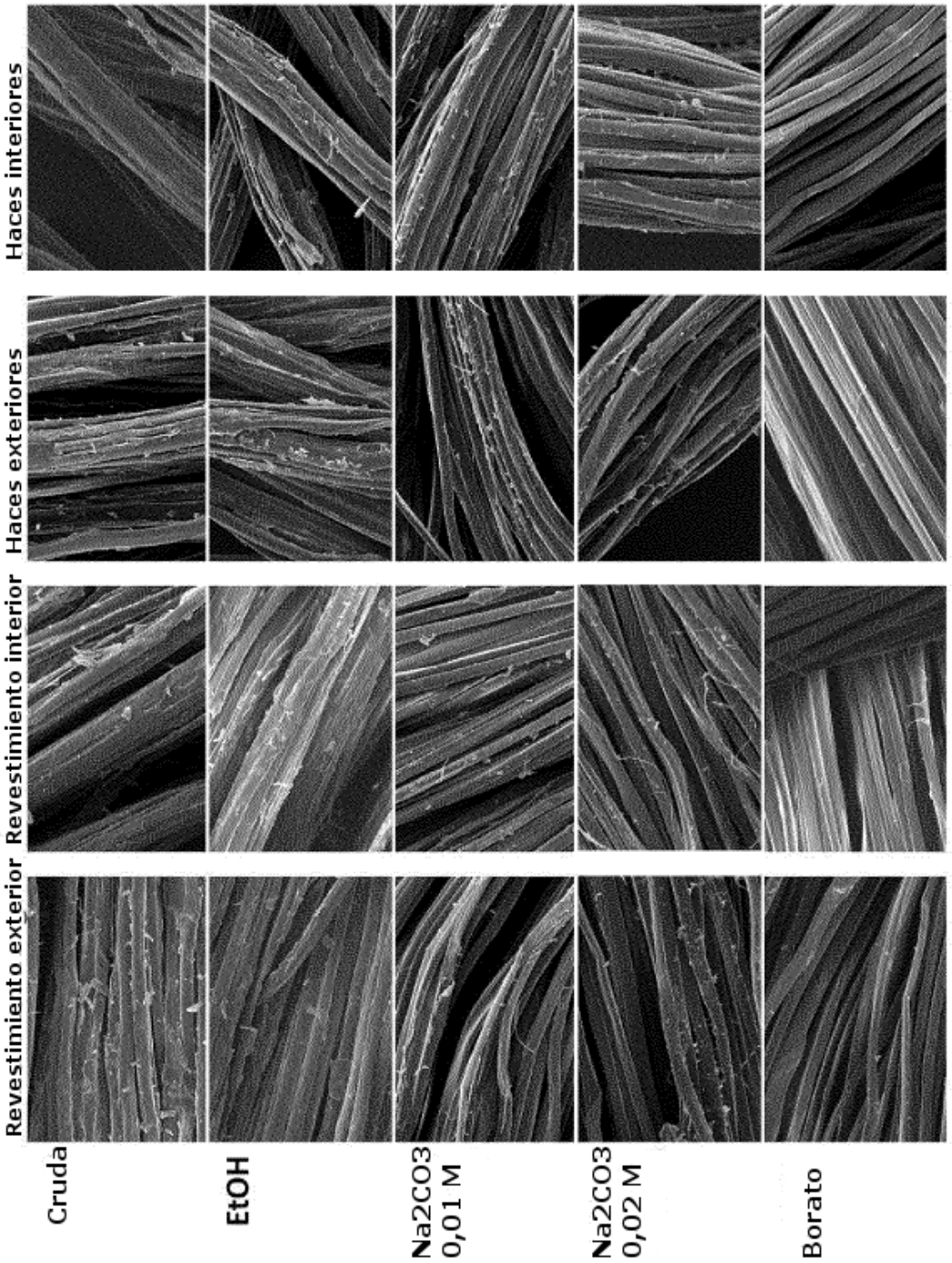

Rigidez [N/mm]
350
300
250
200
150
100
50
0
Control
Na_2CO_3
Borato

Fig. 4

Fig. 5


Revestimiento exterior
Revestimiento interior
Haces exteriores
Haces interiores
Cruda
EtOH
Na2CO3 0,01 M
Na2CO3 0,02 M
Borato

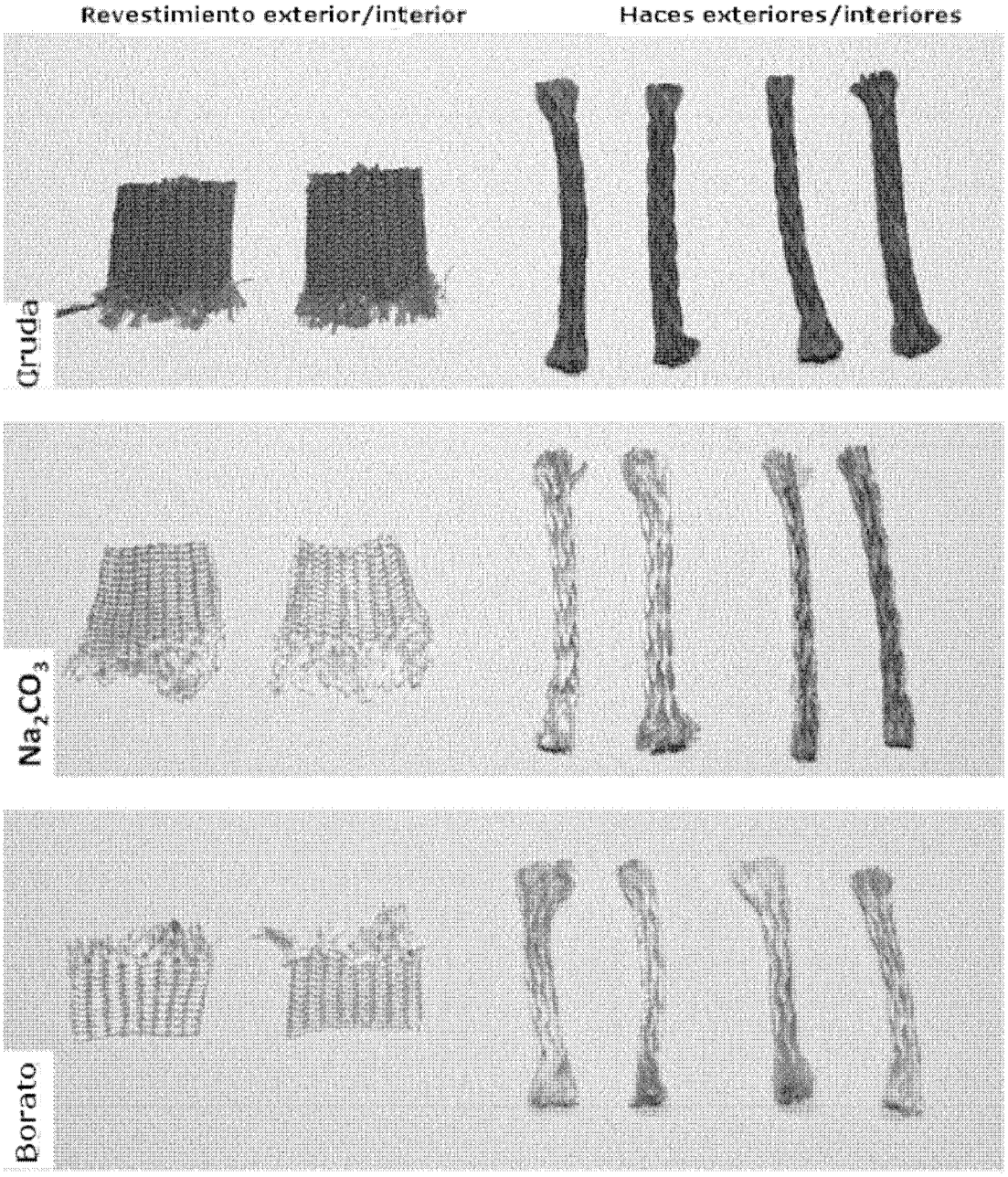

Revestimiento exterior/interior
Haces exteriores/interiores
Gruda
Na_2CO_3
Borato

Fig. 6

Fig. 7

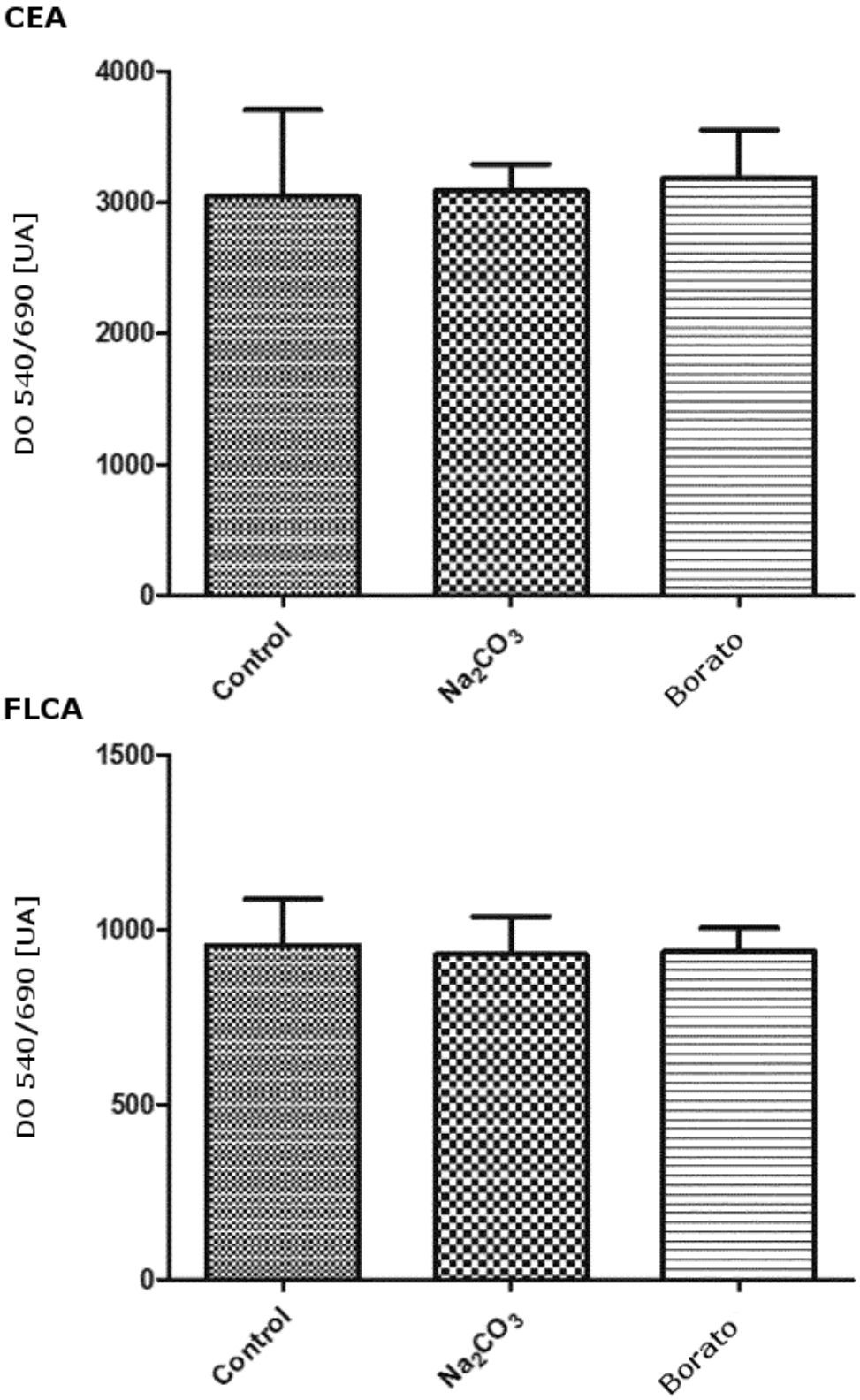
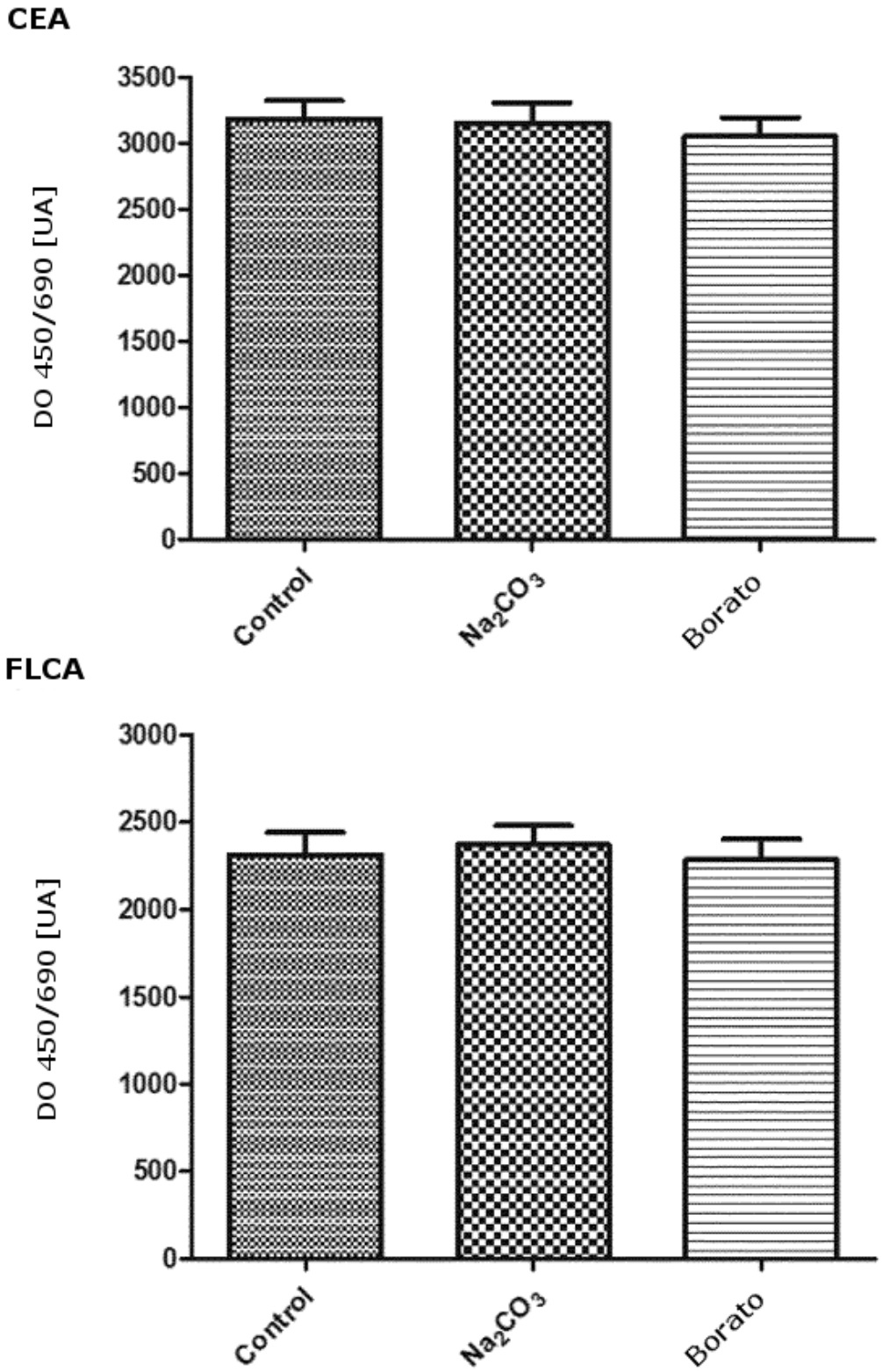

CEA
DO 540/690 [UA]
4000
3000
2000
1000
0
Control
Na_2CO_3
Borato
FLCA
DO 540/690 [UA]
1500
1000
500
0
Control
Na_2CO_3
Borato

Fig. 8


CEA
DO 450/690 [UA]
3500
3000
2500
2000
1500
1000
500
0
Control
Na2CO3
Borato
FLCA
DO 450/690 [UA]
3000
2500
2000
1500
1000
500
0
Control
Na2CO3
Borato

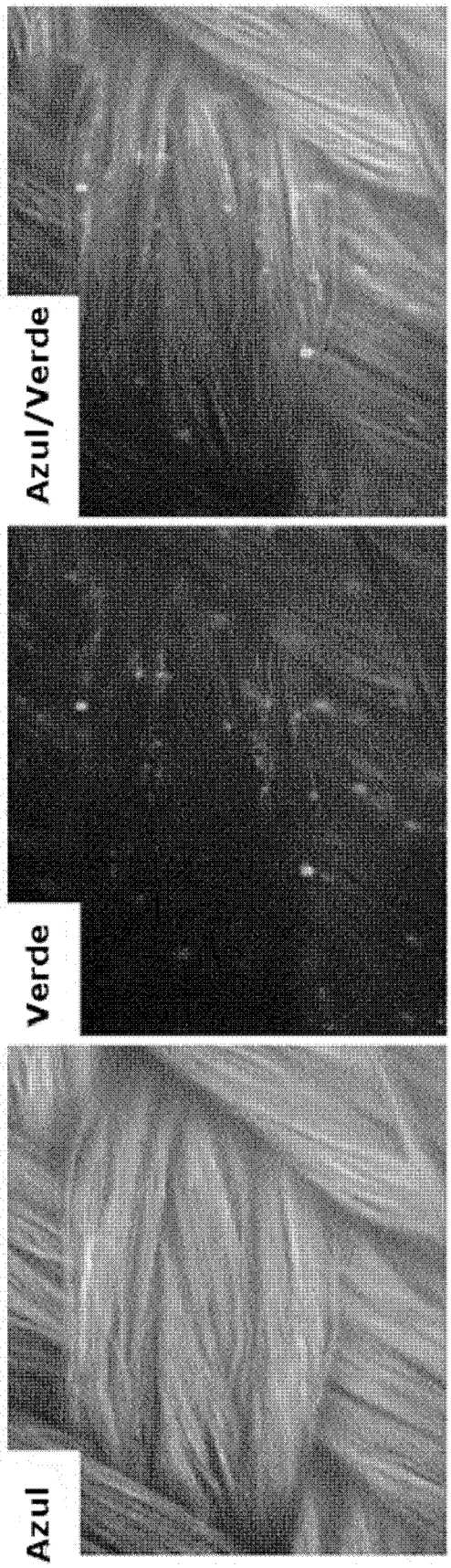


Fig. 9

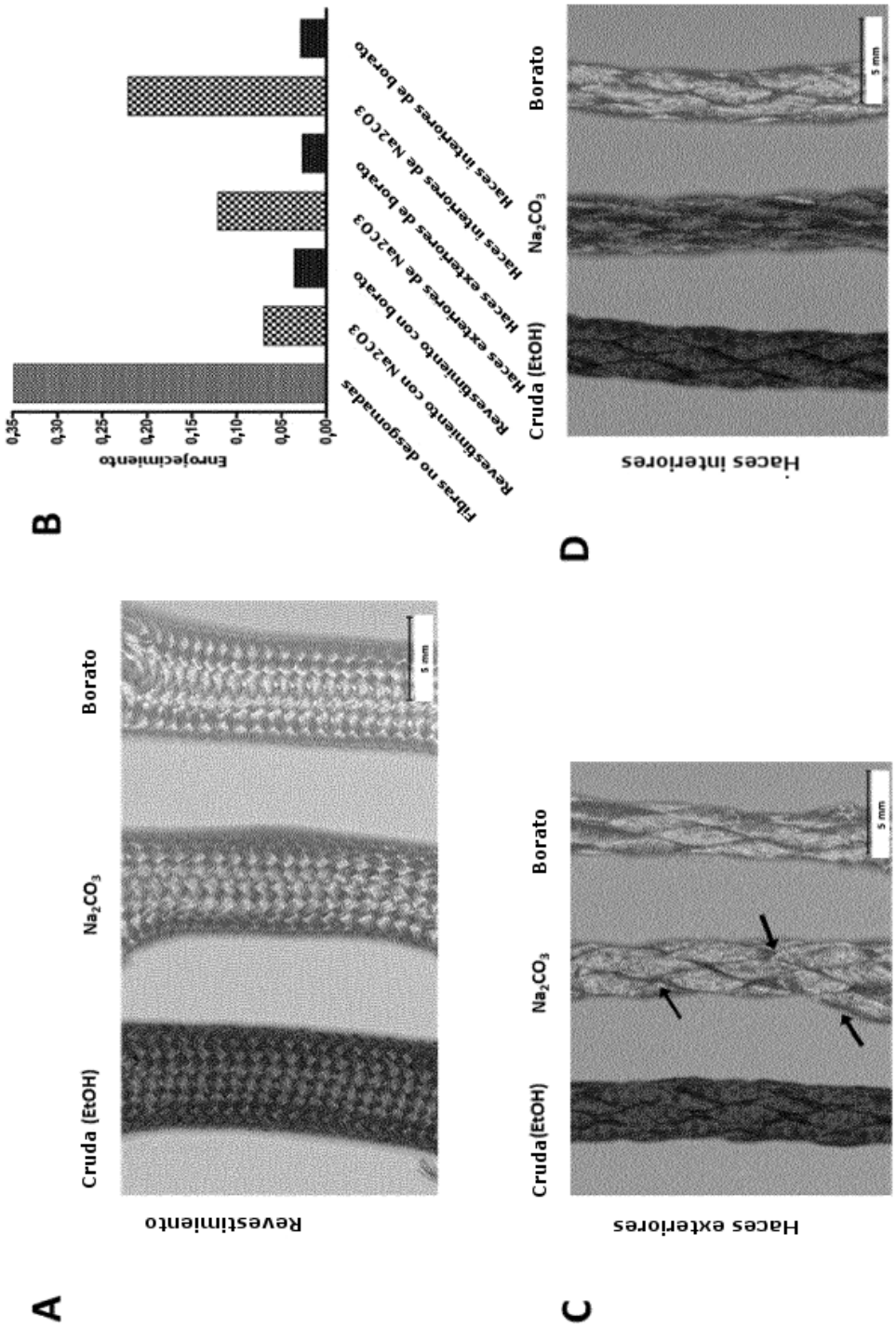
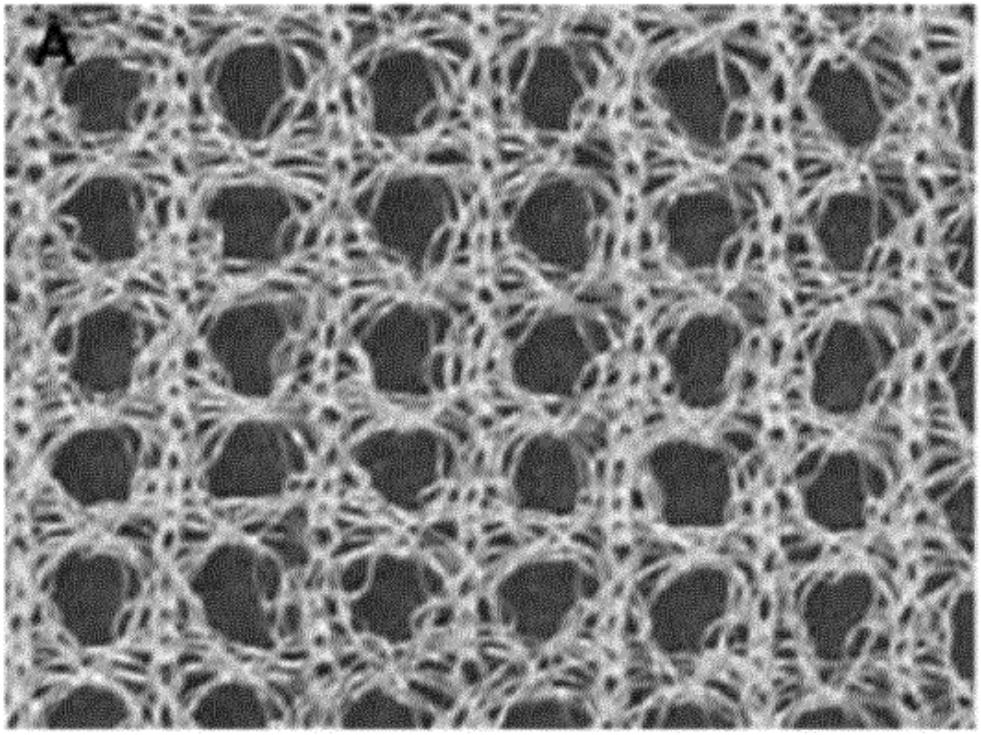

A
Cruda (EtOH)
Na_2CO_3
Borato
Revestimiento
5 mm
B
Enrojecimiento
0,35
0,30
0,25
0,20
0,15
0,10
0,05
0,00
Fibras no desgomadas
Revestimiento con Na2CO3
Revestimiento con borato
Haces exteriores de Na2CO3
Haces exteriores de borato
Haces interiores de Na2CO3
Haces interiores de borato
C
Cruda(EtOH)
Na_2CO_3
Borato
Haces exteriores
5 mm
D
Cruda (EtOH)
Na_2CO_3
Borato
Haces interiores
5 mm

Fig. 10

Fig. 11A



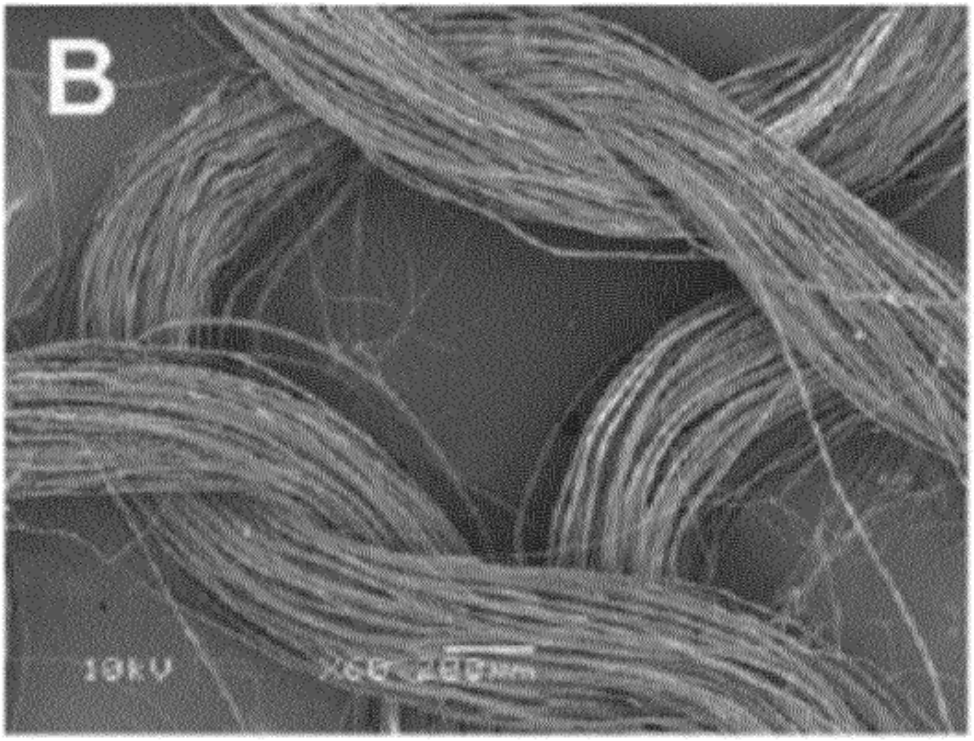


Fig. 11B