

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 701 478**

51 Int. Cl.:

A61L 27/36 (2006.01)

D04H 1/54 (2012.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **27.10.2015 PCT/IB2015/058262**

87 Fecha y número de publicación internacional: **06.05.2016 WO16067189**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **27.10.2015 E 15808028 (3)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **12.09.2018 EP 3212246**

54 Título: **Proceso para la producción de una estructura híbrida que consiste en microfibras y nanofibras de fibroína de seda acopladas, estructura híbrida obtenida de ese modo y su uso como dispositivo médico implantable**

30 Prioridad:
27.10.2014 IT MI20141841

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
22.02.2019

73 Titular/es:
**SILK BIOMATERIALS S.R.L. (100.0%)
Via Cavour 2
22074 Lomazzo, IT**

72 Inventor/es:
ALESSANDRINO, ANTONIO

74 Agente/Representante:
RUO , Alessandro

ES 2 701 478 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

Proceso para la producción de una estructura híbrida que consiste en microfibras y nanofibras de fibroína de seda acopladas, estructura híbrida obtenida de ese modo y su uso como dispositivo médico implantable

5

Campo de la invención

[0001] La presente invención se refiere a un proceso para la producción de una estructura híbrida que consiste en microfibras y nanofibras de fibroína mutuamente acopladas, organizadas posiblemente jerárquicamente en estructuras complejas que comprenden varias estructuras primarias obtenidas a partir del acoplamiento de fibroína nano y microfibras; la invención también se refiere a la estructura híbrida obtenida mediante el proceso, y a su uso como dispositivo médico implantable para su uso en una amplia diversidad de aplicaciones en el campo de la ingeniería de tejidos y la medicina regenerativa.

10

15 **Antecedentes en la técnica**

[0002] En la cirugía moderna, se usan cada vez más los andamios, que son dispositivos implantables que tienen la función de compensar temporalmente la función afectada de partes y tejidos corporales, y que a continuación se colonizan mediante el recrecimiento celular natural de la parte o el tejido dañados para conseguir la regeneración de los mismos.

20

[0003] Los materiales para la producción de andamios pueden ser muy diferentes, dependiendo de la aplicación pretendida. Por ejemplo, por lo general se usan andamios inorgánicos que consisten en mezclas de hidroxiapatita y β -fosfato tricálcico para el reemplazo temporal y el recrecimiento de tejido óseo. Sin embargo, los andamios poliméricos son mucho más habituales, basados preferentemente en biopolímeros o polímeros sintéticos biodegradables y biocompatibles, destinados a reemplazar temporalmente tejidos no rígidos.

25

[0004] Un andamio polimérico debe poseer una serie de propiedades superficiales y másicas optimizadas para la función que va a llevar a cabo *in vivo*. Entre las propiedades de interés se pueden considerar las características morfológicas a nivel nano, micro y macroscópico; las propiedades fisicomecánicas y el rendimiento (de forma ideal, estas deberían ser tan próximas como sea posible a las características y el rendimiento *in vivo* de los tejidos que se regeneran); y las propiedades químicas y biológicas, con referencia particular a la biocompatibilidad (es decir, la capacidad de soportar la adhesión y el crecimiento celular, sin causar reacciones inflamatorias y/o inmunogénicas, ni liberar sustancias nocivas, etc.) y a la biodegradabilidad o la capacidad de biorreabsorción (que debe corresponder con el tiempo de residencia del dispositivo *in vivo*, que a su vez depende de la tasa de reconstrucción del tejido que se repara). Otras propiedades de interés pueden ser porosidad, permeabilidad a los fluidos, capacidad de captación, retención y a continuación liberación, cuando se requiera, de agentes activos, factores de crecimiento o fármacos, etc., en el sitio del implante.

30

35

[0005] Un polímero natural particularmente prometedor para su uso en la producción de andamios es la fibroína, una proteína de la seda producida en la naturaleza por los lepidópteros (especies domésticas: *Bombyx mori*; especies naturales: *Antheraea pernyi*, *Philosamia ricini*, etc.), otros insectos y arácnidos. La fibroína también se puede producir mediante técnicas de ADN recombinante. La fibroína se obtiene a partir de la seda natural con el denominado tratamiento de "descrudamiento", que consiste en la retirada de la capa de sericina que cubre la fibroína; este tratamiento se lleva a cabo generalmente a través de un baño de agua al que se añaden opcionalmente bases inorgánicas (jabón), ácidos o enzimas, a temperaturas de entre 60 y 120 °C, si fuera necesario mediante operación en una autoclave. La fibroína obtenida de ese modo está en forma de microfibras que tienen un diámetro medio de 12-14 μm , con una resistencia final de aproximadamente 600 MPa y valores de elongación en la ruptura de un 25-30 % (valores que se refieren a la microfibra de *B. mori*). Se pueden producir estructuras bi o tridimensionales (hebras, hilos, telas tejidas, telas cosidas, telas no tejidas, redes, trenzas, cuerdas, etc.) con estas microfibras, haciendo uso de tecnologías desarrolladas para aplicaciones de seda en el campo textil y que de ese modo entran dentro del conocimiento habitual del experto en la materia.

40

45

50

[0006] El interés hacia la fibroína se debe principalmente a su biocompatibilidad comprobada, que se expresa a través de la capacidad de soportar el crecimiento y la proliferación de diversos tipos de células, la carencia de reacciones inmunogénicas e inflamatorias, y unas marcadas propiedades angiogénicas, útiles en particular en el caso de la reparación/regeneración de tejidos vivos. Además, las características fisicomecánicas mencionadas anteriormente permiten la producción de andamios con propiedades mecánicas adecuadas para el fin (en particular, alta resistencia a la tracción, doblado, esfuerzo de compresión; buena elasticidad; resiliencia, etc.); finalmente, los andamios hechos de fibroína tienen características de biodegradabilidad a medio-largo plazo *in vivo* (durante unos pocos meses a 1-2 años, dependiendo de las características del entorno biológico del sitio de implante), óptimas para aplicaciones en las que se debe asegurar el soporte mecánico del andamio durante periodos prolongados.

55

60

[0007] Gracias a estas propiedades, ya se ha propuesto en la técnica la fibroína para la producción de andamios.

65

[0008] El acoplamiento de polímeros en forma de fibras a través de disolución parcial y posterior deposición de polímero sobre las fibras se conoce, por ejemplo, del documento de solicitud de Patente DE 1436311 A1.

[0009] El documento de Patente US 8.202.379 B1 describe el acoplamiento de fibras de polímeros naturales o sintéticos mediante el tratamiento de los mismos con mezclas que contienen un líquido iónico y un segundo componente líquido, generalmente agua, un alcohol o una cetona.

[0010] Estos documentos solo describen el acoplamiento de fibras homogéneas en tamaño y propiedades químicas, físicas y mecánicas (que se obtienen a partir del mismo proceso de producción y/o trabajo).

[0011] Los documentos de Solicitud de Patente WO 03/043486 A2, EP 2210971 A1 y WO 2011/031854 A1 describen estructuras de fibroína destinadas a la reconstrucción de ligamentos (en particular el ligamento cruzado anterior de la rodilla), que consisten en una jerarquía de estructuras fibrosas ensambladas a niveles crecientes hasta alcanzar las dimensiones del rendimiento mecánico requerido para la aplicación.

[0012] Los documentos de solicitud de Patente WO 2013/012635 A2, WO 2013/082093 A1 y WO 2012/111309 A1 describen en su lugar dispositivos basados en microfibras de fibroína nativas, que tienen una estructura de red obtenida por tricotado, optimizada para la cirugía de reparación de tejidos dañados en las áreas abdominal y pélvica, para cirugía plástica de la mama, y para la realización de prótesis vasculares, respectivamente.

[0013] Estos andamios se producen a partir de microfibras de fibroína (que, como se ha mencionado, tienen diámetros de aproximadamente 12-14 μm) a través del uso de tecnologías textiles, en las que la hebra básica de seda, que consiste en al menos 20 microfibras de fibroína, se ensambla generalmente mediante operaciones de doblado y torsión en estructuras jerárquicamente superiores ("hilos") cuyas dimensiones transversales pueden variar de una décima parte de milímetro a un milímetro o más. Aunque las estructuras textiles producidas de ese modo tienen habitualmente excelentes características de blandura y suavidad y a nivel macroscópico se adaptan fácilmente a la superficie a la que se adhieren, a nivel microscópico pueden presentar áreas de rigidez de un modo tal que causan reacciones de irritación/inflamación locales; además, debido a su alta cristalinidad y tenacidad, las microfibras de fibroína son capaces de ejercer fuerzas de fricción de tal magnitud que provocan la abrasión de la superficie del tejido con el que entran en contacto; estos problemas pueden conducir, en los peores casos, al fallo parcial o total del implante. Otra desventaja de los andamios de microfibras de fibroína es que presentan proporciones de superficie/volumen desfavorables, de un modo tal que el área total adecuada para la colonización autóloga implica que se sitúe una carga relativamente alta de material en el sitio del implante, con las consecuencias de una sobrecarga potencial de actividad fisiológica y metabólica debido a la acumulación local de los productos de degradación que ha de desechar el organismo. Finalmente, los tiempos naturales de degradación de las microfibras de fibroína pueden ser, en algunos casos, demasiado prolongados en comparación con la tasa de formación de tejido nuevo, y de ese modo interfieren con este crecimiento.

[0014] Con el fin de obviar estas desventajas, se ha propuesto el uso de la fibroína en forma de nanofibras, es decir, que tengan un diámetro menor de un micrómetro y por lo general desde unas pocas decenas hasta unos pocos cientos de nanómetros.

[0015] Estas nanofibras se pueden producir mediante procesos conocidos, en los que la fibroína nativa se solubiliza en primer lugar en un disolvente adecuado, y a continuación se regenera con procesos tales como hilado forzado o electrohilado. En estos procesos, la solución de fibroína se hace pasar a través de un tubo capilar, denominado hiladora, dando lugar a un filamento líquido de dimensiones nanoscópicas, que se acelera hacia un recolector; en el caso del hilado forzado, la aceleración está causada por la fuerza centrífuga (debido a la rotación de la hiladora a una velocidad de varios miles de rpm), mientras que en el caso del electrohilado, está causada por una diferencia de potencial entre la boquilla de la hiladora y un colector, que carga el líquido causando de ese modo la producción de un chorro de solución; gracias a las propiedades viscoelásticas del polímero, el chorro experimenta un proceso de estiramiento que, acompañado por la evaporación simultánea del disolvente, conduce a la producción de la nanofibra que se acumula en el colector.

[0016] Estudios recientes han demostrado las excelentes propiedades de los andamios hechos de nanofibras de fibroína.

[0017] El artículo "In vivo regeneration of elastic lamina on fibroin biodegradable vascular scaffold", I. Cattaneo *et al.*, Int. J. Artif. Organs 36 (2013) 166, muestra que un andamio tubular de fibroína tejida mediante electrohilado, implantado en la porción abdominal de la aorta de una rata, permite la formación de un tejido vascular totalmente similar al nativo desde los puntos de vista morfológico y funcional. El artículo "Decellularized silk fibroin scaffold primed with adipose mesenchymal stromal cells improves wound healing in diabetic mice", S.E. Navone *et al.*, Stem Cell Research & Therapy, 5 (2014) 7, muestra la eficacia de parches de fibroína tejidos mediante electrohilado, activados previamente por contacto con células mesenquimales del tejido adiposo, en la inducción de la curación de heridas en ratones diabéticos a través de mecanismos biológicos que implican la estimulación directa del proceso angiogénico por parte del material.

[0018] También se han descrito andamios hechos mediante acoplamiento de microfibras y nanofibras de fibroína.

[0019] El documento de solicitud de Patente CN 101879330 A describe un dispositivo, propuesto como prótesis vascular y/o guía para la regeneración de nervios, que tiene una estructura tubular de tres capas, en la que la capa interior es un depósito poroso hecho de fibroína regenerada, la capa intermedia es una estructura tubular de microfibras tejidas de fibroína en forma de una red, y la capa exterior consiste en una estructura de fibroína nanofibrosa producida mediante electrohilado. El proceso de producción del dispositivo que se describe en este documento es complejo. La capa interior se produce inicialmente en forma tubular con métodos de tejido convencionales, la capa obtenida de ese modo se sumerge en una solución de fibroína y el producto intermedio resultante se seca a 40-60 °C. Este primer producto intermedio se ajusta sobre un alambre colector para electrohilado, y se deposita una capa de fibroína nano-microfibrosa sobre la superficie exterior de dicho primer producto intermedio mencionado anteriormente por medio de esta técnica; el material compuesto obtenido de ese modo se sumerge a continuación en metanol o etanol durante 1-4 horas. Finalmente, este primer material compuesto se introduce en un molde y se produce la capa porosa sobre su superficie tubular interior mediante depósito a partir de una solución de fibroína; la porosidad de la capa más interior se obtiene por tratamiento a temperaturas entre -80 °C y -10 °C. Las tres capas de este material compuesto están unidas conjuntamente por medio de películas de fibroína que se forman sobre la superficie de la misma durante las inmersiones en disolventes o en soluciones de fibroína. Sin embargo, las películas de fibroína producidas de acuerdo con el proceso de este documento, una vez secas y cristalizadas, son extremadamente frágiles, de un modo tal que se fracturan inmediatamente en cuanto se ven apremiadas por un esfuerzo mecánico de tracción, doblado, compresión, etc.; esto puede conducir a la creación de una discontinuidad morfológica y mecánica entre las diferentes capas que puede conducir fácilmente a una pérdida de las características geométricas y de rendimiento, tales como deformación por fluencia en frío y/o el colapso de las capas más débiles desde el punto de vista mecánico (en particular las nanofibras).

[0020] El documento de solicitud de Patente CN 102499800 A describe un dispositivo que puede encontrar aplicación como endoprótesis vascular o prótesis para la reparación de pequeños vasos sanguíneos, que consiste también en este caso en una estructura híbrida con tres capas; la capa interior y la capa intermedia están hechas de estructuras nanofibras obtenidas mediante electrohilado de una mezcla de fibroína/policaprolactona, mientras que la capa exterior consiste en una estructura tubular de microfibras de fibroína, producida con una máquina de trenzado. Las tres capas, producidas por separado y ajustadas una sobre la parte superior de la otra en forma de mangas, se mantienen juntas por medio de una serie de puntadas anulares. En parte, este dispositivo tiene las mismas desventajas que el anterior; además, el hecho de que el acoplamiento se lleve a cabo con puntadas separadas entre sí deja libertad parcial de movimiento de los diversos componentes; en condiciones de trabajo de estrés desde el punto de vista mecánico y biológico, tales como las que se pueden producir en el transcurso del implante *in vivo*, esto podría crear un estrés local de una magnitud tal que interfiera con el proceso de regeneración en curso, específicamente si el material está expuesto a flujos de fluidos fisiológicos.

[0021] El objeto de la presente invención es proporcionar un material compuesto híbrido hecho de micro y nanofibras de fibroína que permita la producción de andamios para aplicaciones médicas sin las desventajas de la técnica anterior.

Sumario de la invención

[0022] Este objeto se consigue con la presente invención, que en un primer aspecto de la misma se refiere a un proceso para la producción de una estructura híbrida hecha de microfibras y nanofibras de fibroína de seda acopladas entre sí, que comprende las siguientes etapas:

- a) preparación de una o más partes hechas de fibroína microfibrosa;
- b) preparación de una o más partes hechas de fibroína nanofibrosa;
- c) tratamiento de dichas una o más partes de fibroína nanofibrosa y de dichas una o más partes de fibroína microfibrosa, por separado o después de acoplamiento, con un disolvente para fibroína y/o con una solución que comprende fibroína disuelta en un disolvente;
- c') si en la etapa c) las partes nanofibras y microfibras se han tratado por separado con un disolvente para fibroína y/o con una solución que comprende fibroína disuelta en un disolvente, acoplamiento de dichas partes;
- d) consolidación de la estructura microfibrosa/nanofibrosa híbrida obtenida en la etapa c) o la etapa c') mediante tratamiento térmico a una temperatura entre 10 °C y 150 °C, durante un tiempo entre 1 minuto y 24 horas;
- e) retirada del disolvente por lavado con agua o una mezcla de agua-alcohol o por evaporación a temperaturas entre 10 °C y 100 °C, posiblemente al vacío,

en el que el disolvente usado en la etapa c) se selecciona entre: ácido fórmico, 1,1,1,3,3,3-hexafluoro-2-propanol, ácido trifluoroacético, hexafluoroacetona, N-óxido de N-metilmorfolina, líquidos iónicos, mezclas de cloruro de calcio-etanol-agua, mezclas de nitrato de calcio-metanol-agua, soluciones acuosas de sales de litio y las mezclas entre estos disolventes y/o con agua.

[0023] El proceso de la invención puede comprender además las siguientes etapas adicionales:

- f) acoplamiento de dos o más estructuras híbridas micro/nanofibras obtenidas de acuerdo con las etapas a) a e) para formar una estructura jerárquica superior;
- g) consolidación de la estructura jerárquica superior obtenida de ese modo por repetición de las mismas etapas c) a e) mencionadas anteriormente.

[0024] En un segundo aspecto de la misma, la invención se refiere a dispositivos médicos implantables que usan las estructuras híbridas obtenidas con dicho proceso.

Breve descripción de las figuras

[0025] La invención se describirá con detalle en lo sucesivo en el presente documento por referencia a las figuras acompañantes, en las que:

- la Figura 1 muestra esquemáticamente un aparato para llevar a cabo la operación de acoplamiento de las partes nanofibras y microfibras de acuerdo con la invención;
- las Figuras 2 y 3 muestran micrografías obtenidas con un microscopio de barrido electrónico (SEM) de muestras de estructuras híbridas producidas de acuerdo con la invención;
- la Figura 4 muestra micrografías similares a las de las Figuras 2 y 3 obtenidas en muestras de estructuras híbridas producidas de acuerdo con la técnica anterior;
- la Figura 5 muestra los espectros de IR de las estructuras híbridas producidas de acuerdo con la invención en comparación con muestras de microfibras de fibroína solas o nanofibras de fibroína solas;
- la Figura 6 muestra gráficos de calorimetría diferencial de barrido (DSC) que se refieren a las estructuras híbridas producidas de acuerdo con la invención y a las microfibras de fibroína solas o las nanofibras de fibroína solas;
- la Figura 7 muestra diagramas de carga/elongación de las muestras de estructuras híbridas producidas de acuerdo con la invención y de microfibras de fibroína solas o nanofibras de fibroína solas;
- la Figura 8 muestra diagramas de carga/elongación de muestras de estructuras híbridas producidas de acuerdo con la técnica anterior;
- la Figura 9 muestra esquemáticamente un aparato para llevar a cabo los ensayos de pelado sobre las capas de las estructuras híbridas;
- la Figura 10 muestra los gráficos de fuerza aplicada/golpe de pelado obtenidos en ensayos de desprendimiento de las capas de estructuras híbridas de la invención y de la técnica anterior;
- la Figura 11 muestra gráficos representativos de crecimiento celular en dispositivos médicos hechos con estructuras híbridas de la invención; y
- la Figura 12 muestra histogramas que se refieren a las medidas de genotoxicidad en muestras de parche hechas con microfibras solas, nanofibras solas y con las estructuras híbridas hechas de fibroína de la invención.

Descripción detallada de la invención

[0026] En la presente descripción y en las siguientes reivindicaciones, el término "parte" significa un cuerpo formado a partir de fibras homogéneas de fibroína, es decir, solo microfibras o solo nanofibras, mientras que la expresión "estructura híbrida" significa un cuerpo formado mediante el acoplamiento de al menos una parte formada a partir de nanofibras y al menos una parte formada a partir de microfibras.

[0027] Los inventores han descubierto que mediante la combinación de nanofibras y microfibras de fibroína de acuerdo con el proceso que se describe en lo sucesivo en el presente documento, es posible formar estructuras híbridas provistas con propiedades mecánicas adaptadas para la producción de dispositivos médicos implantables.

[0028] Las nanofibras útiles para los fines de la invención tienen diámetros entre 20 nm y 1,5 µm, y preferentemente entre 0,4 y 1 µm. En su lugar, las microfibras tienen por lo general diámetros entre aproximadamente 10 y 15 µm; las microfibras también se pueden acoplar a hilos de múltiples fibras, que contienen incluso hasta 500 filamentos de seda individuales. En el resto del texto, también se usa la unidad de medición den, habitual en la tecnología textil, definida como el peso en gramos de 9000 metros de fibra o hilo.

[0029] En el primer aspecto de la misma, la invención se refiere al proceso de producción de estructuras híbridas micro/nanofibras mediante el acoplamiento de una o más partes microfibras de fibroína y una o más partes nanofibras de fibroína.

[0030] La etapa a) del proceso consiste en la preparación de una o más partes de fibroína microfibras. La parte microfibras de fibroína confiere la forma y la resistencia mecánica al dispositivo médico final; por lo tanto, como primera etapa del proceso, es necesario preparar una parte microfibras de fibroína que tenga una forma y unas dimensiones que correspondan básicamente con las del dispositivo deseado. Se usa fibroína microfibras como material de partida para la producción de esta parte en forma de un hilo de seda que tiene un recuento de entre 10 den y 400 den, y preferentemente entre 15 den y 100 den. El hilo de seda se puede usar después de descruceamiento o se puede usar en bruto y realizar el descruceamiento después de la producción de la parte. La

- fibroína microfibrrosa se puede añadir con agentes bioactivos incluyendo factores de crecimiento, fármacos, células, antibióticos, agentes antivirales, enzimas, vitaminas, etc., por ejemplo por medio de reacciones químicas y/o enzimáticas. Esta adición se puede realizar antes de la etapa a), durante cualquiera de las etapas c) a g), o más tarde. Esta parte se puede formar mediante uno o más elementos obtenidos mediante cualquiera de las técnicas conocidas en la industria textil, tal como tejido de trama-urdimbre (obteniendo un tejido ortogonal), técnicas de producción de tela no tejida, tricotada, trenzada, o la técnica conocida como "devanado de filamentos", que consiste en el devanado de hilos, de acuerdo con patrones variables de entrelazamiento, alrededor de un eje de rotación, lo que conduce a la obtención de estructuras cilíndricas huecas.
- 5
- 10 **[0031]** La etapa b) del proceso consiste en la preparación de una o más partes de fibroína nanofibrosas. Las partes de fibroína nanofibrosas útiles para los fines de la invención se pueden obtener a través de hilado forzado, o preferentemente a través de electrohilado, de una solución de fibroína.
- 15 **[0032]** La solución de partida se prepara por disolución de la fibroína en un disolvente seleccionado entre ácido fórmico, 1,1,1,3,3,3-hexafluoro-2-propanol, ácido trifluoroacético, o líquidos iónicos tales como cloruro de 1-etil-3-metilimidazolio, cloruro de 1-butil-3-metilimidazolio, acetato de 1-etil-3-metilimidazolio, 1-etil-3-metilimidazolio glicina, cloruro de 1-alil-3-metilimidazolio, cloruro de 1-butil-2,3-dimetilimidazolio, bromuro de 1-butil-3-metilimidazolio y las mezclas entre estos disolventes y/o con agua; los líquidos iónicos preferentes para los fines de la invención son cloruro de 1-etil-3-metilimidazolio, cloruro de 1-butil-3-metilimidazolio, acetato de 1-etil-3-metilimidazolio y 1-etil-3-metilimidazolio glicina.
- 20
- 25 **[0033]** La solución de partida tiene una concentración de fibroína de entre un 1 % p/v y un 30 % p/v, preferentemente entre un 6 % p/v y un 10 % p/v, en ácido fórmico; o, alternativamente, una concentración de fibroína de entre un 5 % p/v y un 40 % p/v, preferentemente entre un 10 % p/v y un 30 % p/v, en los otros disolventes indicados; la concentración porcentual en peso/volumen (% p/v) indica los gramos de fibroína disueltos en 100 ml de disolución.
- 30 **[0034]** El método preferente de producción de la parte de fibroína nanofibrrosa es electrohilado, cuyos métodos de ejecución generales conoce el experto en la materia: con el fin de obtener una fibroína nanofibrrosa adecuada para los fines de la invención, la solución se somete a electrohilado con una diferencia de potencial entre la boquilla de la hiladora y el colector entre 5 kV y 100 kV, preferentemente entre 15 kV y 35 kV, con una distancia entre dicha boquilla y el colector entre 35 cm y 60 cm, preferentemente entre 10 cm y 20 cm. La boquilla de la hiladora puede tener diámetros de entre 0,01 mm y 10 mm, preferentemente entre 0,1 mm y 1 mm.
- 35 **[0035]** Tanto en el caso de hilado forzado como en el caso de electrohilado, la solución de partida se puede añadir con agentes bioactivos incluyendo factores de crecimiento, fármacos, células, antibióticos, agentes antivirales, enzimas, vitaminas, etc., que de ese modo se integran en el dispositivo médico y a continuación se pueden liberar desde el mismo en el sitio del implante, con el fin de estimular el proceso de regeneración del área corporal para la que se pretende dicho dispositivo. La fibroína nanofibrrosa se puede añadir con agentes bioactivos que incluyen factores de crecimiento, fármacos, células, antibióticos, agentes antivirales, enzimas, vitaminas, etc., por ejemplo por medio de reacciones químicas y/o enzimáticas. Esta adición se puede realizar durante cualquiera de las etapas c) a g), o más tarde.
- 40
- 45 **[0036]** Las etapas previas se han nombrado como a) y b) solo con fines de claridad de ilustración, pero esto no implica un orden temporal de ejecución; las partes nano y microfibrosas se producen por separado, y las dos etapas se pueden llevar a cabo en cualquier secuencia.
- 50 **[0037]** Después de su preparación, en la etapa c) del proceso, las partes de fibroína microfibrrosa y nanofibrrosa se tratan con un disolvente o una solución que contiene fibroína adicional. En esta etapa, una fracción superficial de las fibras pasa a la fase de gel, formando una película alrededor de las fibras presentes. El tratamiento con dicho disolvente o solución puede tener lugar en dichas partes separadas, o después de ponerlas en contacto entre sí.
- 55 **[0038]** En el caso de tratamiento con disolvente solo, este se selecciona entre: un líquido iónico que puede ser cloruro de 1-etil-3-metilimidazolio, cloruro de 1-butil-3-metilimidazolio, acetato de 1-etil-3-metilimidazolio, 1-etil-3-metilimidazolio glicina, cloruro de 1-alil-3-metilimidazolio, cloruro de 1-butil-2,3-dimetilimidazolio, bromuro de 1-butil-3-metilimidazolio o las mezclas de los mismos, puros o en una mezcla con agua; ácido fórmico; ácido trifluoroacético; 1,1,1,3,3,3-hexafluoro-2-propanol; hexafluoroacetona; mezclas de cloruro de calcio-etanol-agua; mezclas de nitrato de calcio-metanol-agua; N-óxido de N-metilmorfolina; o soluciones acuosas de sales de litio (bromuro de litio, tiocianato de litio). Los disolventes preferentes para este tratamiento son cloruro de 1-etil-3-metilimidazolio, cloruro de 1-butil-3-metilimidazolio, acetato de 1-etil-3-metilimidazolio, acetato de 1-etil-3-metilimidazolio o 1-etil-3-metilimidazolio glicina, puros o las mezclas de los mismos con agua con un contenido de agua de entre un 5 % p/p y un 50 % p/p y preferentemente entre un 10 % p/p y un 25 % p/p; otro disolvente preferente para los fines de la invención es ácido fórmico.
- 60
- 65 **[0039]** La exposición al disolvente de las partes de fibroína nanofibrosas y microfibrosas (por separado o ya en contacto entre sí) puede tener lugar de acuerdo con diferentes métodos, tales como, por ejemplo:

- inmersión en el disolvente, durante un tiempo entre 1 segundo y 240 minutos, preferentemente entre 30 segundos y 30 minutos;
- deposición del disolvente por vertido, revestimiento, atomización, electropulverización o electrohilado, en una cantidad entre 0,001 ml/cm² y 0,5 ml/cm², preferentemente entre 0,01 ml/cm² y 0,1 ml/cm²; estas cantidades se refieren a la superficie aparente de las partes, es decir, las deducidas de la multiplicación simple de la longitud y la anchura de las propias partes (la distribución del peso de la superficie de la parte es generalmente insignificante), y no a la superficie global de las fibras individuales;
- exposición a los vapores del disolvente, durante un tiempo entre 1 segundo y 120 minutos, preferentemente entre 30 segundos y 30 minutos.

[0040] La temperatura a la que se realiza el contacto entre las microfibras y el disolvente es variable entre 40 y 80 °C, preferentemente entre 50 y 70 °C; también es posible operar a temperaturas menores de 40 °C, pero en este caso el tiempo de ejecución del proceso se hace muy largo y no es adecuado para la producción industrial. Para las nanofibras, la temperatura a la que se realiza el contacto con el disolvente es variable entre la temperatura ambiente y 70 °C, preferentemente entre 40 y 60 °C.

[0041] En el caso del tratamiento separado de las dos partes antes de su acoplamiento, es posible tratar una de las dos con disolvente solo, y la otra con una solución de fibroína en un disolvente (no necesariamente la misma que la del tratamiento con disolvente solo).

[0042] También es posible tratar una o ambas partes en sucesión con el disolvente solo para causar una gelificación inicial de las fibras, y a continuación con una solución de fibroína para impartir una alícuota adicional de polímero disuelto y facilitar el acoplamiento posterior de las partes.

[0043] Para una ejecución óptima del proceso de la invención, el tiempo de contacto entre las fibras y el disolvente se debería reducir, en los intervalos mencionados anteriormente, con el aumento de temperatura y con la disminución de las dimensiones de los hilos o las dimensiones de las partes que se tratan. Por ejemplo, para el mismo grosor de microfibras, los tiempos de contacto adecuados con el disolvente serán entre aproximadamente 30 segundos y 3 minutos a temperaturas entre 70 y 80 °C, y entre aproximadamente 15 minutos y una hora para temperaturas entre 40 y 50 °C. En lo que respecta a las nanofibras, estos tiempos de contacto varían entre 30 segundos y un minuto a 70 °C, y entre aproximadamente 5 y 30 minutos a temperaturas entre 40 y 50 °C.

[0044] Los tiempos de contacto, con la misma temperatura, también varían dependiendo de la densidad aparente de la parte, es decir, la cantidad de fibras por unidad de volumen de la misma, especialmente en el caso de partes hechas de microfibras; permaneciendo aún en los intervalos generales que se han mencionado anteriormente, el tiempo de contacto adecuado para una fibra disminuye, por ejemplo pasando de crepé a sarga, de sarga a organdí, y de organdí a tela no tejida.

[0045] Teniendo en cuenta estas directrices generales, el experto en la materia es capaz de seleccionar las condiciones de operación óptimas adecuadas para la obtención del acoplamiento eficaz de las partes de microfibras y nanofibras disponibles.

[0046] En el caso del tratamiento de una solución de fibroína, la solución se produce con los mismos disolventes mencionados anteriormente para el tratamiento con el disolvente solo. Preferentemente, la solución se basa en cloruro de 1-etil-3-metilimidazolio, cloruro de 1-butil-3-metilimidazolio, acetato de 1-etil-3-metilimidazolio o 1-etil-3-metilimidazolio glicina, puros o mezclados con agua (contenido de agua entre un 5 % p/p y un 50 % p/p, preferentemente entre un 10 % p/p y un 25 % p/p), con una concentración de fibroína entre un 5 % p/v y un 40 % p/v, preferentemente entre un 10 % p/v y un 30 % p/v; o se basa en ácido fórmico con una concentración de fibroína entre un 1 % p/v y un 30 % p/v, preferentemente entre un 6 % p/v y un 10 % p/v.

[0047] El contacto entre la solución de fibroína y las partes de fibroína nanofibras y microfibras se puede producir a través de la inmersión en disolvente o la deposición del mismo sobre dichas partes (ya en contacto entre sí o a separadas), con los mismos métodos, programación y cantidades indicadas anteriormente en el caso del tratamiento con el disolvente solo.

[0048] Si dichas partes no estuvieran ya en contacto entre sí antes de dichos tratamientos con disolvente o solución, estas se ponen en contacto entre sí en la etapa c'), obteniendo una estructura híbrida micro/nanofibrosa.

[0049] En el caso de dispositivos de geometría plana, las partes nanofibras y microfibras se apilan (sitúan) una en la parte superior de la otra de acuerdo con el número y las secuencias deseados. En el caso de dispositivos médicos tubulares, las partes nanofibras y microfibras se "ajustan" una en la parte superior de la otra de acuerdo con el número y las secuencias deseados. En el caso de estructuras híbridas tridimensionales distintas de tubulares, se hace que las partes nanofibras y microfibras se adhieran entre sí de acuerdo con el número y las secuencias deseadas.

[0050] En las etapas c) y c') es posible añadir a la estructura híbrida que se está formando agentes bioactivos, incluyendo factores de crecimiento, fármacos, células, antibióticos, agentes antivirales, enzimas, vitaminas, etc., dispersando tales agentes bioactivos en los disolventes y/o soluciones usados. De este modo, los agentes bioactivos entran en contacto con las partes componentes de la estructura híbrida y se pueden incorporar a la misma y por lo tanto a los dispositivos médicos implantables en los que se usan.

[0051] En la etapa d) del proceso, la estructura híbrida obtenida de ese modo se somete a continuación a tratamiento térmico para fortalecer el acoplamiento entre las dos o más partes de fibroína, de las cuales al menos una de fibroína nanofibrosa y al menos una de fibroína microfibrosa. Este tratamiento se lleva a cabo sobre la estructura híbrida impregnada con el disolvente, a una temperatura entre 10 °C y 150 °C; preferentemente, la temperatura de tratamiento es entre 80 °C y 120 °C cuando se usa un líquido iónico en la etapa previa, y entre 20 °C y 50 °C cuando se usan ácido fórmico u otros disolventes en la etapa previa. La duración del tratamiento es entre 1 minuto y 24 horas.

[0052] Preferentemente, durante la etapa d), el conjunto de partes que se acopla se somete a compresión, por lo general a valores entre 0,5 y 5 kg/cm², preferentemente entre 0,1 y 1 kg/cm², para aumentar la eficacia del proceso de distribución sobre ambos tipos de fibras de la fibroína gelificada formada en la etapa c).

[0053] Esta operación se puede llevar a cabo, por ejemplo, por medio de un aparato tal como el que se muestra en la Figura 1. El aparato incluye un elemento 10 de calentamiento en la parte inferior, sobre el que descansa una placa 11; en su parte superior, el aparato incluye una segunda placa 12. Las dos placas tienen que estar hechas de material rígido, térmicamente conductor y no adherente. El elemento de calentamiento debe permitir un control fino de la temperatura, en el intervalo de las temperaturas de tratamiento que se han mencionado anteriormente, con una precisión de ± 0,5 °C, mejor ± 0,1 °C, con el fin de permitir la gestión del proceso de gelificación con la precisión necesaria. De acuerdo con el método de operación preferente que se ha descrito anteriormente, se aplica una ligera presión (que se muestra en la figura por medio de la flecha dirigida hacia abajo y mediante la indicación "P") sobre la placa superior durante la etapa de calentamiento usando un peso y/o un sistema de cierre que acerque las dos placas entre sí de un modo tal que no dejen ningún espacio vacío entre las partes de fibroína, ni entre dichas partes y las placas. Finalmente, el dispositivo se cierra preferentemente en una cámara aislante térmica, accesible desde el exterior, con el fin de prevenir las pérdidas de calor que pudieran perjudicar la eficacia del proceso de gelificación. La disposición óptima de las dos partes de fibroína que se acoplan es como se muestra en la figura, con la parte microfibrrosa 14, menos sensible a los efectos del calor combinada con el líquido iónico, en contacto con la placa 11 adyacente al elemento de calentamiento, mientras que la parte nanofibrosa 13 está en contacto con la placa superior 12. Esta configuración (parte microfibrrosa más cercana al elemento de calentamiento y parte nanofibrosa más alejada del mismo) también es preferente en el caso de las estructuras híbridas jerárquicamente superiores obtenidas de acuerdo con las etapas f) y g) del proceso, cuando lo permite el orden de apilamiento de las partes.

[0054] En el caso de partes tubulares, el acoplamiento se lleva a cabo, por ejemplo, con un aparato que consiste en un cilindro que puede ser sólido o hueco, hecho de material rígido, térmicamente conductor y no adherente y con un diámetro ligeramente mayor que el diámetro de las partes que se acoplan (con la diferencia de diámetro preferentemente entre 0,05 mm y 3 mm). El eje debe estar conectado a un sistema adecuado para ajustar la temperatura del mismo entre 10 °C y 150 °C y puede estar contenido en una cámara aislante térmica; esta cámara se puede controlar termostáticamente y permitir el control de temperatura en el mismo intervalo. En este modo de operación, una de las partes se ajusta sobre el eje y a continuación la otra parte se ajusta sobre la primera, sacando partido en ambos casos de la elasticidad de las partes de fibroína. La diferencia de tamaño entre el eje y las partes genera una presión radial de las partes más exteriores sobre las partes más interiores, estimulando la adhesión y el acoplamiento de las mismas partes. La configuración preferente en este modo de operación se determina mediante el objetivo final del dispositivo producido; por lo tanto, a modo de ejemplo, para la fabricación de dispositivos médicos para la reparación/regeneración de vasos sanguíneos, la parte nanofibrosa se montará en contacto con el eje mientras que la parte microfibrrosa se ajustará sobre la parte nanofibrosa.

[0055] En la etapa e) del proceso, el disolvente se retira por lavado con agua o una mezcla de agua-alcohol, o mediante evaporación. El lavado se lleva a cabo a una temperatura entre 10 °C y 100 °C, preferentemente entre 20 °C y 50 °C, durante un tiempo entre 2 minutos y 180 minutos, preferentemente entre 10 minutos y 60 minutos; los alcoholes preferentes en el caso del uso de mezclas de agua-alcohol son metanol y etanol, con concentraciones en agua entre un 5 % v/v y un 50 % v/v y preferentemente entre un 10 % v/v y un 30 % v/v. Si el disolvente se retira por evaporación, esta se lleva a cabo a una temperatura entre 10 °C y 100 °C posiblemente al vacío, preferentemente entre 15 °C y 55 °C durante un tiempo entre 10 minutos y 168 horas y preferentemente entre 30 minutos y 72 horas.

[0056] Las etapas c) y d) del proceso conducen a una solubilización/gelificación superficial parcial del material fibroso que componen las partes adyacentes. La siguiente etapa e) de retirada del disolvente causa la coagulación de la fracción de fibroína gelificada; el paso de la fibroína desde el estado de gel al estado sólido (coagulado) que tiene lugar en las áreas de contacto entre las estructuras conduce a la formación de "uniones", puntos de unión y fusión entre microfibras y nanofibras. Esto forma una estructura híbrida que consiste en microfibras y nanofibras soldadas conjuntamente y que constituye una parte individual.

[0057] Una vez se ha producido una estructura híbrida micro/nanofibrosa como se ha descrito anteriormente, esta se puede acoplar a otras o a varias estructuras similares para formar estructuras complejas organizadas jerárquicamente, llevando a cabo las etapas f) y g) opcionales mencionadas anteriormente.

5 [0058] El segundo aspecto de la invención se refiere a los dispositivos médicos implantables que usan las estructuras híbridas obtenidas con el proceso que se ha descrito de ese modo hasta el momento.

10 [0059] Los dispositivos médicos implantables de la invención se usan principalmente como andamios para la reparación de tejidos y órganos humanos y animales con un enfoque de medicina regenerativa. Entre los tejidos y órganos diana los presentes inventores pueden mencionar, entre otros, tejidos del sistema nervioso periférico (nervios periféricos), sistema vascular (venas, arterias, fístulas arteriovenosas para acceso vascular), sistema cardiovascular (arterias coronarias y músculo cardíaco), sistema nervioso central (espina dorsal), piel y sus capas, tejidos de contención y protección de órganos internos (duramadre, pericardio, pleura, peritoneo, etc.), tejidos del sistema musculoesquelético (tendones, ligamentos, músculos) y dispositivos para la contención de hernias y prolapsos.

15 [0060] La forma y el tamaño del dispositivo depende del tejido u órgano diana; a continuación se enumeran los tamaños y las formas aproximados de los dispositivos destinados para algunos de los fines mencionados anteriormente y que se consiguen usando las estructuras híbridas de la invención, pero serán evidentes otros usos posibles (y las formas y tamaños de los dispositivos pertinentes) para el experto en la materia:

- dispositivos tubulares con un diámetro interior de entre 2 mm y 8 mm y un grosor de pared de entre 0,2 mm y 4 mm en el caso de vasos sanguíneos periféricos;
- 25 - dispositivos tubulares con un diámetro interior de entre 1 mm y 6 mm y grosor de pared de entre 0,2 mm y 1 mm en el caso de nervios periféricos;
- dispositivos cilíndricos sólidos con un diámetro exterior de entre 2 mm y 15 mm en el caso de tendones y ligamentos;
- dispositivos planos con un grosor de entre 0,1 mm y 5 mm en el caso de la piel y sus capas;
- 30 - dispositivos planos con un grosor de entre 0,05 mm y 2 mm en el caso de tejidos de contención y protección de órganos internos tales como duramadre, pericardio, pleura, peritoneo;
- dispositivos planos con un grosor de entre 0,05 mm y 2 mm en el caso de dispositivos para la contención de hernias y prolapsos.

35 [0061] La invención se ilustrará adicionalmente mediante los siguientes ejemplos.

EJEMPLO 1

[0062] Este ejemplo describe la producción de filamentos de fibroína microfibrosa y de partes (fibras, telas) obtenidas a partir de estos filamentos.

40 [0063] Se sometieron capullos de *B. mori* a hilado para producir un hilo de seda en bruto. Después de doblado y torsión, el hilo se descrudeció con agua a presión a 120 °C durante 30 min para retirar la sericina. Para la producción de telas, el hilo en bruto se tejió en primer lugar en los tejidos deseados y la tela obtenida de ese modo se descrudeció a continuación a 95-98 °C durante 1 hora, en presencia de tensioactivos para retirar la sericina. Para producir la tela no tejida, los capullos se cortaron y se dejaron macerar para retirar la sericina. La seda de fibra corta obtenida de ese modo (denominada "shappe") se sometió a cardado. El velo de cardado se consolidó en un no tejido mediante punzonado.

45 [0064] Se produjo lo siguiente con los filamentos obtenidos de ese modo:

- 50 - un hilo de seda descrudecida (trama de 3 hilos; recuento 17,1 x 3 den);
- una tela de seda descrudecida que tiene las siguientes características: tejido: crepé; n.º de hilos/cm en urdimbre: 58 (recuento: 15,3 x 3 den); n.º de hilos/cm en trama: 39 (recuento: 15,3 x 3 den); masa por área unitaria: 55 g/m²; grosor de 0,12 mm;
- 55 - una tela de seda descrudecida que tiene las siguientes características: tejido: organdí; n.º de hilos/cm en urdimbre: 53 (recuento: 20,7 den); n.º de hilos/cm en trama: 39 (recuento: 23,4 den); masa por área unitaria: 30 g/m²; grosor de 0,09 mm;
- una tela de seda descrudecida que tiene las siguientes características: tejido: sarga; n.º de hilos/cm en urdimbre: 55 (recuento: 15,3 x 3 den); n.º de hilos/cm en trama: 43 (recuento: 15,3 x 4 den); masa por área unitaria: 60 g/m²; grosor de 0,09 mm;
- 60 - una tela no tejida (TNT) de seda descrudecida, que tiene las siguientes características: longitud de fibra: 20-27 mm; masa por área unitaria: 33 g/m².

65 [0065] Estas muestras se usan para los ensayos de los siguientes ejemplos.

EJEMPLO 2

[0066] Este ejemplo describe la producción de partes de fibroína nanofibrosas.

5 [0067] Se descrudieron capullos de *B. mori* con agua destilada en autoclave a 120 °C durante 30 min, para retirar la sericina.

10 [0068] Después de lavar de forma exhaustiva y secar a temperatura ambiente, se disolvieron 1 g de microfibras de fibroína en 10 ml de una solución saturada de LiBr (aproximadamente 9,3 M) durante 3 horas a 60 °C. Después de la dilución con un volumen igual de agua destilada, la solución de fibroína se dializó durante 3 días contra agua destilada para retirar la sal. La solución de fibroína resultante se diluyó hasta 67 ml con agua, dando como resultado una solución acuosa de un 1,5 % p/v de fibroína. La solución, dividida en alícuotas de 15 ml, se vertió en moldes con un diámetro de 5 cm y se dejó evaporar a temperatura ambiente, para obtener películas de fibroína que tienen un espesor medio de 50 µm.

15 [0069] Justo antes del proceso de electrohilado, se disuelven 2 g de película en 25 ml de ácido fórmico a temperatura ambiente, para obtener una solución con una concentración de polímero igual a un 8 % p/v.

20 [0070] Para la producción de las partes de fibroína nanofibrosas, se carga la solución de fibroína en ácido fórmico en una jeringa de polipropileno unida a una bomba de jeringa (Graseby Medical, MS 2000) con un tubo capilar de PTFE. El sistema de electrohilado consiste en dos fuentes de alimentación de alta tensión (F.u.G. Elektronik GmbH, HCN 35-12500) capaces de generar hasta 25 kV. El polo positivo está conectado a la hiladora, que consiste en un tubo capilar de acero con un diámetro interior de 0,5 mm, capaz de moverse en dirección transversal al colector. El polo negativo está conectado al colector, que consiste en un cilindro giratorio de 20 cm x 8 cm (l x d); las partes de nanofibroína se obtienen de este modo en forma de cuerpos cilíndricos huecos, que a continuación se cortan longitudinalmente y se depositan para formar partes generalmente planas. Se producen varias muestras de partes de fibroína electrotejidas usando los siguientes parámetros experimentales: concentración de fibroína = 8 % en peso; tensión = 24 kV; flujo = 3 ml/h; distancia hiladora/colector = 10 cm; tiempo de recogida = 6 horas. Al final del electrohilado, las partes de fibroína se desprenden del colector, se tratan con una solución de agua-alcohol durante 30 min a temperatura ambiente y se secan al aire. Estas partes tienen un espesor medio de 50 µm.

EJEMPLO 3

35 [0071] El ensayo que se describe en este Ejemplo se destina a determinar la cantidad de líquido iónico que puede estar retenido en las diferentes partes de la fibroína nano o microfibrosa.

[0072] Se evalúan las propiedades de las cuatro telas de fibroína nanofibrosa mencionadas en el Ejemplo 1 (organdí, crepé, sarga y tela no tejida) y de una parte de la fibroína nanofibrosa del Ejemplo 2.

40 [0073] El líquido iónico que se usa para el ensayo es acetato de 1-etil-3-metilimidazolio.

45 [0074] El ensayo se lleva a cabo de acuerdo con dos métodos de impregnación, mediante inmersión de las muestras en el líquido seguido de drenado por goteo por gravedad, y mediante deposición superficial mediante un cepillo. En ambos casos, se evalúa la cantidad de líquido retenido inmediatamente después de la impregnación y después del escurrido, medido como el porcentaje en peso con respecto al peso de la muestra; el escurrido se lleva a cabo por compresión de las muestras obtenidas mediante inmersión con una fuerza de 0,5 kg/cm² durante 60 minutos, y compresión de las muestras obtenidas mediante deposición superficial con una fuerza de 0,1 kg/cm² durante 2 minutos. Los resultados obtenidos se muestran en la Tabla 1.

50

Tabla 1

	Cantidad de líquido retenido por la muestra (% en peso)			
	Inmersión		Deposición superficial	
	Sin escurrir	Después de escurrir	Sin escurrir	Después de escurrir
Nanofibra	503 ± 124	55 ± 12	81 ± 8	11 ± 1
Organdí	394 ± 16	18 ± 2	131 ± 4	16 ± 4
Crepé	280 ± 8	6 ± 3	154 ± 15	40 ± 4
Sarga	325 ± 6	6 ± 2	155 ± 23	35 ± 10
TNT	4850 ± 750	22 ± 2	n/a	n/a

EJEMPLO 4

[0075] Acoplamiento de las partes nano y microfibras de acuerdo con la invención.

5 **[0076]** Se tratan una muestra de una tela de organdí y una de tela de crepé del Ejemplo 1, y una muestra de la parte nanofibrosa del Ejemplo 2, que tienen un tamaño de 3 x 5 cm, con líquido iónico con revestimiento superficial y escurrido como en el Ejemplo 3.

10 **[0077]** A continuación se produce una estructura híbrida de organdí/parte nanofibrosa y una estructura híbrida de crepé/parte nanofibrosa con los materiales impregnados de ese modo, introduciendo los materiales acoplados en el aparato que se muestra esquemáticamente en la Figura 1.

15 **[0078]** Cada par de materiales se introduce en dicho aparato con la capa de microfibras (organdí o crepé) en la parte inferior, en contacto directo con la placa de calentamiento; se aplica una ligera presión (0,1 kg/cm²) a la placa superior. El aparato se sitúa en una cámara termostática para prevenir pérdidas de calor y la temperatura de la placa inferior se eleva a 55 °C durante 5 minutos. Al final de este periodo, el aparato se retira de la cámara termostática y se deja que se enfríe a temperatura ambiente (en aproximadamente 10 minutos), después de lo cual se inyecta una mezcla con una concentración de un 80 % p/p de alcohol etílico en agua entre las dos placas con una jeringa.

20 **[0079]** Las placas se abren a continuación y la estructura híbrida se transfiere a un baño de la misma mezcla de agua-alcohol para retirar todas las trazas de líquido iónico residual; la estructura híbrida se deja en este baño durante 24 horas.

25 **[0080]** Al final de este periodo, la estructura híbrida se aclara en agua destilada para retirar el alcohol y se sitúa entre varias capas de toallas de papel que se cambian periódicamente hasta el secado completo de la estructura (tardando aproximadamente 12 horas).

EJEMPLO 5

30 **[0081]** Caracterización química de estructuras híbridas nano y microfibras de la invención.

[0082] Se evaluó la composición de aminoácidos de las partes microfibras y nanofibras de fibroína separadas y de la estructura híbrida obtenida en el Ejemplo 4.

35 **[0083]** Se hidrolizaron aproximadamente 25 mg de material de cada una de las tres muestras con HCl 6 N, a 105 °C, durante 24 horas al vacío. Las soluciones de hidrolizado obtenidas de ese modo se analizaron con un analizador automático de aminoácidos de intercambio iónico. Los resultados del análisis se muestran en la Tabla 2.

Tabla 2

	Aminoácidos (% en moles)		
	Parte micro	Parte nano	Estructura híbrida
Ácido aspártico	1,91	1,66	1,55
Treonina	1,22	0,84	1,49
Serina	11,10	10,57	11,10
Ácido glutámico	1,25	1,48	1,34
Prolina	0,68	0,84	0,82
Glicina	43,82	44,88	44,47
Alanina	29,34	29,54	28,93
Cistina	-	-	-
Valina	2,28	2,31	2,10
Metionina	-	-	-
Isoleucina	1,08	0,94	1,32
Leucina	0,65	0,45	0,68
Tirosina	4,80	4,73	4,54

	Aminoácidos (% en moles)		
	Parte micro	Parte nano	Estructura híbrida
Fenilalanina	0,37	0,56	0,46
Lisina	0,53	0,31	0,44
Histidina	0,30	0,23	0,25
Arginina	0,66	0,67	0,50
<i>Total</i>	100,00	100,00	100,00

EJEMPLO 6 (COMPARATIVO)

[0084] Acoplamiento de partes nano y microfibras de acuerdo con la técnica anterior.

5 **[0085]** Con fines comparativos, se produjeron cuatro muestras que consisten en nanofibras y microfibras de fibroína acopladas siguiendo el procedimiento del documento de Patente CN 101879330 A.

10 **[0086]** Usando los mismos materiales de partida que en el Ejemplo 4, se producen dos estructuras híbridas de acuerdo con el siguiente procedimiento:

- la parte de nanofibra y la tela de microfibra (organdí o crepé) se ponen en contacto y se impregnan con una solución acuosa de fibroína al 4 % en peso;
- el sistema acoplado resultante se trata a 60 °C durante 30 minutos y posteriormente se sumerge en una solución de agua-alcohol al 80 % p/p de metanol durante 15 minutos;
- los dos sistemas acoplados se someten a continuación a secado a temperatura ambiente, en condiciones controladas de temperatura y humedad (20 °C, 65 % de humedad relativa).

20 **[0087]** Las dos muestras de estructura híbrida obtenidas de ese modo se denominan en lo sucesivo en el presente documento "Película SF".

EJEMPLO 7 (COMPARATIVO)

[0088] Acoplamiento de partes nano y microfibras de acuerdo con la técnica anterior.

25 **[0089]** Se repite el procedimiento del Ejemplo 6, siendo la única diferencia que después de poner en contacto las partes de fibroína y de la impregnación de las mismas con la solución acuosa de fibroína al 4 % en peso, el sistema se consolida por congelación a -20 °C y posterior liofilización.

30 **[0090]** Las dos muestras de estructura híbrida obtenidas de ese modo se denominan en lo sucesivo en el presente documento "Gel SF".

EJEMPLO 8

35 **[0091]** Caracterizaciones morfológicas de estructuras híbridas nano y microfibras de la invención y de la técnica anterior.

40 **[0092]** La estructura híbrida de organdí/parte nanofibrosa producida en el Ejemplo 4 se observó en un microscopio de barrido electrónico (SEM, mod. MIRA 3, Tescan). Con fines comparativos, también se observaron muestras de tela de organdí y de la parte nanofibrosa antes del acoplamiento. Se seleccionó la tela de organdí dado que la disposición abierta de los hilos de urdimbre y trama deja algunas separaciones a través de las cuales es posible caracterizar la superficie de la parte nanofibrosa en el lado adyacente a la parte microfibras (lado de acoplamiento).

45 **[0093]** Para este fin, se tomaron muestras de 0,5 x 0,5 mm de la estructura híbrida, se situaron en portamuestras de aluminio para SEM con una cinta adhesiva de doble cara, y se revistieron con oro-paladio mediante pulverización iónica. Se examinaron ambos lados expuestos al aire, el de las microfibras y el de las nanofibras.

[0094] Las micrografías de las muestras se muestran en la Figura 2.

50 **[0095]** La Figura 2-A y la Figura 2-B muestran el tejido de organdí microfibras y la parte nanofibrosa, respectivamente, antes del acoplamiento; la última tiene los rasgos habituales de un sustrato obtenido mediante electrohilado, con nanofibras de fibroína que tienen un diámetro medio de 500-600 nm, que descansan irregularmente (como tela no tejida) y con una porosidad muy fina. Después del acoplamiento, la parte microfibras

(Figura 2-C) presenta un ligero aplanamiento de los hilos componentes, probablemente debido a la presión ejercida en las diversas etapas del proceso de acoplamiento; sin embargo, los hilos de urdimbre y trama aún conservan su estructura original y las microfibras individuales de las que están hechos aún son muy visibles.

5 **[0096]** Entre los poros de la tela (Figuras 2-D y 2-E), se puede observar la superficie de la parte nanofibrosa acoplada, que conserva su rugosidad habitual visible con bajo aumento y, en algunas áreas (Figura 2-E), se pueden observar áreas parcialmente gelificadas con más evidencia que microfibras y nanofibras conectadas y mantenidas en contacto cercano.

10 **[0097]** La Figura 2-F muestra la superficie de la parte nanofibrosa expuesta al aire después de acoplamiento. Aunque existen áreas de fusión de las nanofibras, se conserva la morfología habitual observada en la parte nativa sin tratar.

15 **[0098]** Las Figuras 3-A y 3-F (especialmente la Figura 3-F) muestran la presencia de una capa delgada de gel que reviste tanto las microfibras como las nanofibras, conectándolas con conexiones interfibras. La capa de gel es extremadamente delgada y superficial, mostrando a través la superficie de las microfibras individuales y además la de las nanofibras, cuya morfología está solo ligeramente deformada en la superficie mientras que se conserva básicamente en la parte de material restante.

20 **[0099]** Finalmente, la Figura 3-B muestra un área periférica de la estructura híbrida, a lo largo del borde del corte con el que se tomó la muestra sometida a observación de SEM. Esta imagen muestra que el proceso de acoplamiento de la invención es eficaz y que las dos partes acopladas no se separan incluso si se someten a deformación y compresión, como ocurre habitualmente en el área sometida al corte con tijeras o escalpelo.

25 **[0100]** Con fines de comparación, se examina una muestra de la técnica anterior bajo SEM, producida de acuerdo con el procedimiento del Ejemplo comparativo 6 (muestra de "Película SF" de organdí). Las imágenes de esta muestra se muestran en las Figuras 4-A y 4-B, y muestran la presencia de una película sobre la superficie de las microfibras, aplastada y adherida solo a la última e incapaz de servir como adhesivo eficaz con la parte nanofibrosa.

30 EJEMPLO 9

[0101] Caracterización fisicoquímica de las estructuras híbridas de la invención.

35 **[0102]** La estructura híbrida de organdí/nanofibrosa producida en el Ejemplo 4 se caracteriza adicionalmente mediante espectroscopia infrarroja transformada de Fourier (FTIR) con el fin de verificar si el proceso de acoplamiento causa cambios en la estructura fisicoquímica, y las propiedades estructurales y conformacionales de los componentes micro y nanofibras.

40 **[0103]** Se usó un espectrómetro NEXUS Thermo Nicolet en modo ATR (Reflectancia Total Atenuada), con un accesorio Smart Performer equipado con una celda de cristal SeZn. Los espectros de FTIR se registraron en el intervalo de número de ondas de $4000-700\text{ cm}^{-1}$, acumulando 64 barridos con una resolución de 4 cm^{-1} . Cada espectro es el promedio de tres mediciones (Figura 5).

45 **[0104]** La región espectral de $1900-700\text{ cm}^{-1}$ representa la huella dactilar de la fibroína desde el punto de vista de la composición y la estructura del polímero. Las bandas conformacionalmente sensibles más significativas se conocen como Amida I ($1615-1690\text{ cm}^{-1}$), Amida II (1509 cm^{-1}), y Amida III ($1230-1260\text{ cm}^{-1}$), obtenidas a partir de una multiplicidad de modos vibracionales del enlace peptídico. Amida I se debe principalmente a vibraciones de estiramiento en el enlace CO, con una contribución del enlace CN; Amida II se debe a la flexión del enlace NH (principalmente) con la contribución del estiramiento del enlace CN; Amida III se debe a las vibraciones de flexión de NH y estiramiento de CN.

50 **[0105]** La Figura 5-A muestra, superpuestos, los espectros de las microfibras antes del tratamiento (curva (a)) y de la estructura híbrida de la invención (curva (b)); de forma similar, la Figura 5-B muestra, superpuestos, los espectros de las nanofibras antes del tratamiento (curva (A)) y de la estructura híbrida de la invención (curva (B)).

55 **[0106]** Basándose en la posición y la intensidad de las bandas Amida I, II y III en los espectros, se puede deducir que tanto las microfibras como las nanofibras, antes del tratamiento de acoplamiento, tienen la conformación molecular en lámina β habitual, característica de materiales de fibroína cristalinos nativos (microfibras) o regenerados (películas, nanofibras, etc.).

60 **[0107]** Los perfiles espectrales después del acoplamiento se superponen exactamente a los de las respectivas muestras sin tratar, lo que indica que se conservan las características estructurales del material.

65 **[0108]** Los dos componentes de la banda Amida III se usaron para calcular el índice de cristalinidad de los materiales antes y después del proceso de acoplamiento. El índice de cristalinidad se obtiene a partir de la proporción entre la intensidad de la banda a 1260 cm^{-1} y la de la banda a 1230 cm^{-1} ($C_1 = I_{1260} / I_{1230}$). Para las

microfibras, este índice permanece básicamente sin cambios después del acoplamiento, cambiando de 0,52 a 0,51, mientras que para las nanofibras disminuye en aproximadamente un 8 %, de 0,60 a 0,55. Este comportamiento es consistente con la transformación de una fracción de la parte nanofibrosa que durante el proceso de gelificación y la posterior coagulación adquiere una estructura menos ordenada que la preexistente, cambiando a una fase de transición con propiedades adhesivas, como se muestra en las micrografías del Ejemplo 8.

EJEMPLO 10

[0109] Caracterización estructural de las estructuras híbridas de la invención.

[0110] La estructura híbrida de organdí/parte nanofibrosa producida en el Ejemplo 4 se caracteriza adicionalmente mediante calorimetría diferencial de barrido (DSC).

[0111] Se usó un calorímetro 200 Q de TA Instruments, registrando las curvas de la temperatura ambiente a 500 °C con una velocidad de calentamiento de 10 °C/min con flujo de nitrógeno; cada muestra, que pesó aproximadamente 5 mg, se introdujo en un crisol de aluminio y se analizó por duplicado. Los resultados del ensayo se muestran en la Figura 6, que muestra los termogramas para las microfibras solas (curva (a)), para las nanofibras solas (curva (b)) y para la estructura híbrida de la invención (curva (c)).

[0112] Como se puede observar, todas las curvas muestran una primera endoterma a una T inferior a 100 °C que se puede atribuir a la evaporación de la humedad contenida en el material.

[0113] En el caso de las microfibras, sigue una segunda endoterma muy intensa, con un pico a 313 °C, atribuida a la degradación térmica de la fibroína en forma de fibra cristalina y orientada con una conformación de lámina β .

[0114] El termograma de las nanofibras antes del tratamiento (curva (b)) tiene un perfil similar, en el que, sin embargo, la segunda endoterma se encuentra a una temperatura inferior (282 °C), lo que indica un grado de orientación muy inferior de la fase cristalina y un tamaño cristalino mucho más irregular que en el caso de las microfibras.

[0115] El diagrama térmico de la muestra de estructura híbrida (curva (c)) muestra las transiciones características de las dos partes componentes: el pico de degradación de las nanofibras a 282 °C permanece sin cambios, mientras que el de las microfibras se traslada a 308 °C, posiblemente debido a interacciones intermoleculares en las áreas de contacto mutuo muy cercano presentes en los materiales acoplados de la invención.

EJEMPLO 11

[0116] Caracterización mecánica de estructuras híbridas de la invención y de la técnica anterior.

[0117] Se llevaron a cabo ensayos de tracción en una muestra del Ejemplo 4, que consistió en el acoplamiento de una parte nanofibrosa (grosor de 50 μm) y una tela de tejido de organdí como componente microfibroso (grosor de 90 μm); con fines comparativos, también se midieron las propiedades de tiras de la parte nanofibrosa y la tela microfibrosa separadas.

[0118] El grosor de las muestras antes y después del acoplamiento se midió de acuerdo con el método de la norma UNI EN ISO 5084:1998. Los valores obtenidos se usaron para calcular los parámetros mecánicos de esfuerzo y módulo. Las propiedades mecánicas se midieron en tiras de las partes como tales y de la estructura híbrida, teniendo un tamaño de 20 x 10 mm (longitud x anchura), usando un dinamómetro Instron mod. 4501, con una longitud de calibración de 10 mm, y una velocidad de travesaño de 10 mm/min. Las mediciones se llevaron a cabo en una atmósfera estándar a 20 °C y 65 % de humedad relativa. Los valores de esfuerzo, deformación y módulo se calcularon a partir de las curvas de carga-elongación y representan la media de diez mediciones para cada muestra.

[0119] Los resultados obtenidos se muestran en los gráficos de la Figura 7 y se resumen en la Tabla 3.

[0120] Las curvas de carga-elongación de la parte microfibrosa (Figura 7-A) se caracterizan por una etapa inicial de estiramiento de los hilos que componen la estructura textil. Una vez estirados, se produce una elongación adicional atribuible a las características inherentes de elasticidad del hilo, que se oponen a una resistencia creciente de la propia elongación, como se muestra mediante el aumento gradual de los valores de carga. Finalmente, se produce la ruptura después de una elongación de aproximadamente un 50 %. Las características destacadas de esta parte son una elevada tenacidad, una elongación igualmente alta y un módulo inicial relativamente bajo.

[0121] Por el contrario, la parte nanofibrosa (Figura 7-B) tiene una respuesta mecánica a la tracción diametralmente opuesta; valores de tenacidad y elongación bajos, módulo inicial muy alto.

[0122] La estructura híbrida de la invención (Figura 7-C) presenta un comportamiento mecánico que no es simplemente el resultado de la suma de los componentes individuales del sistema, sino que en su lugar presenta

desviaciones de aditividad que suponen una interacción muy estricta y específica entre las dos partes componentes. De hecho, la estructura híbrida se caracteriza por una resistencia inicial muy elevada a la carga aplicada. Esta resistencia se atribuye a la interacción cercana entre las dos partes en su interfaz. A medida que aumenta la carga, las curvas de carga-elongación se vuelven irregulares, lo que se atribuye a la ruptura secuencial de los puntos de contacto entre las partes microfibrosa y nanofibrosa. Esta fase se extiende a valores de elongación de un 20-25 %, significativamente mayores que los de la parte nanofibrosa como tal, que no se estira más de un 6-7 %. El aumento adicional en la carga revela la contribución de la parte microfibrosa que a continuación se rompe para elongaciones entre un 45 % y un 50 %, un valor muy similar al de la parte como tal.

10 **[0123]** Los valores mecánicos medidos durante los ensayos, incluyendo también esfuerzo y módulo, se muestran en la Figura 7-D y se resumen en la Tabla 3.

Tabla 3

	Microfibras	Nanofibras	Micro/nanofibras híbridas
Esfuerzo (MPa)	63,7 ± 0,5	20,8 ± 5,0	41,9 ± 1,6
Elongación (%)	48,0 ± 1,3	6,4 ± 1,5	44,7 ± 3,3
Módulo (MPa)	14,9 ± 1,1	82,2 ± 7,0	56,5 ± 7,2

15 **EJEMPLO 12 (COMPARATIVO)**

[0124] Con fines comparativos, se repite el ensayo del Ejemplo 11 en una muestra de la técnica anterior (muestra de "Gel SF" con tela de organdí, producida como se describe en el Ejemplo 7).

20 **[0125]** Se produjo una lámina de fibroína porosa sola, siguiendo el mismo procedimiento y vertido de la solución acuosa, antes de congelación y liofilización, en un molde.

[0126] Se sometieron tiras de 20 x 10 mm de estas muestras al mismo ensayo que el Ejemplo previo, en condiciones idénticas.

25 **[0127]** Los resultados se muestran en la Figura 8 para la lámina porosa (A) y para la estructura híbrida micro/nano (B), respectivamente.

30 **[0128]** La lámina porosa (Figura 8-A) tiene muy malas propiedades mecánicas: el valor medio de la resistencia a la carga es 1,1 ± 0,2 N, aproximadamente 10 veces inferior que una parte nanofibrosa (11,2 ± 1,8 N: véase la Figura 7-B); la variabilidad de la forma de la curva se debe a la heterogeneidad de la textura de los materiales porosos de la fibroína de seda obtenida con el método que se ha descrito anteriormente.

35 **[0129]** Las curvas de carga-elongación de la estructura híbrida micro/nano (B) acoplada usando fibroína porosa (Figura 8-B) se caracterizan por la presencia de dos picos, uno para valores bajos y otro para valores altos de deformación. El pico para deformación baja corresponde a la ruptura del componente nanofibroso, como se indica mediante la carga y la elongación en los valores de ruptura (15 ± 2 N y 5,5 ± 0,2 %, respectivamente).

40 **[0130]** El pico a alta deformación corresponde a la ruptura del sustrato microfibroso (carga: 40 ± 3 N; elongación en la ruptura: 29 ± 3 %).

EJEMPLO 13

45 **[0131]** Medición de la resistencia de adhesión de estructuras híbridas de la invención y de la técnica anterior.

50 **[0132]** Se sometieron dos muestras de la invención del Ejemplo 4, preparadas a partir de telas de organdí y crepé, y dos muestras (organdí y crepé) para cada uno de los materiales de "Película SF" y "Gel SF" de la técnica anterior, producidas como se describe en los Ejemplos 6 y 7, respectivamente, a ensayos mecánicos diseñados para medir la resistencia de adhesión entre los dos componentes micro y nanofibroso de las estructuras híbridas. Los ensayos se llevaron a cabo usando un dinamómetro Instron mod. 4501, de acuerdo con el método de la norma UNI EN ISO 13937-2:2000.

55 **[0133]** En particular, se toman tiras rectangulares de 10 x 40 mm para cada una de las muestras. En un extremo de la muestra, se separan cuidadosamente dos solapas, una corresponde a la parte nanofibrosa y una a la parte microfibrosa, en un tramo de aproximadamente 10 mm; estas solapas se fijan a las mordazas del dinamómetro, como se muestra en la Figura 9. La mordaza superior (móvil) se acciona a continuación, separándola de la parte inferior (fija) a una velocidad de travesaño de 2 mm/min, y la fuerza requerida (medida en cN) para conseguir la separación de la parte microfibrosa (inferior) de la parte nanofibrosa (superior) se registró continuamente para un tramo de al menos 20-30 mm. Se llevaron a cabo al menos 5 ensayos para cada muestra y se promediaron los

resultados individuales. Se muestran las curvas habituales de "carga/golpe de pelado" en la Figura 10-A. Los resultados obtenidos a partir del procesamiento de los datos experimentales se muestran en la Tabla 4 y en el diagrama de barras de la Figura 10-B.

5

Tabla 4

	Fuerza de separación (cN)					
	Invención		"Película SF"		"Gel SF"	
	Media	Máxima	Media	Máxima	Media	Máxima
Microfibra de crepé	53 ± 11	72 ± 12	29 ± 6	58 ± 9	11 ± 5	18 ± 5
Microfibras de organdí	21 ± 9	31 ± 11	10 ± 5	24 ± 10	5 ± 2	9 ± 2

EJEMPLO 14

[0134] Estudios de citotoxicidad y genotoxicidad *in vitro*.

10

[0135] En vista de la aplicación para la producción de andamios para el implante en el cuerpo humano y animal, se evaluaron las propiedades biológicas *in vitro* de los materiales compuestos de la invención.

15

[0136] Los ensayos se llevaron a cabo con dos modelos de células humanas, fibroblastos humanos (MGM18004E) y células endoteliales humanas (HUVEC).

20

[0137] Los fibroblastos humanos se cultivaron en medio de cultivo DMEM con alto contenido en glucosa (Gibco) que contenía un 20 % de suero bovino fetal inactivado por tratamiento térmico (Gibco), L-glutamina 200 mM (Euroclone), penicilina y estreptomycin (Euroclone).

25

[0138] Las células endoteliales humanas se cultivaron en medio de cultivo EBM-2 (medio basal para células endoteliales 2, Lonza), que contenía penicilina y estreptomycin (Euroclone).

30

[0139] Los ensayos analíticos se diseñaron para evaluar el grado de proliferación celular y de daño del ADN como marcadores de citotoxicidad y genotoxicidad potencial del biomaterial.

35

[0140] El ensayo Alamar Blue® mide la actividad metabólica de las células, que está directamente relacionada con la proliferación celular. Las células se sembraron en placas de 96 pocillos con una densidad inicial de 6000 células/cm². Se usaron el medio de cultivo solo y las células solas como blanco. Los ensayos se llevaron a cabo por triplicado técnico y duplicado biológico. Las células se cultivaron durante 24, 72 y 120 horas en una incubadora a 37 °C, en presencia de un 5 % de CO₂. El medio de cultivo se cargó en el día 3. Al final del periodo de incubación, se añadió un volumen fijo de Alamar Blue® (10 % del volumen total) al pocillo. Después de un periodo adicional de incubación de 18 horas, el medio se transfirió a otra placa y se registraron los valores de absorbancia a 570 nm y 600 nm con un lector Multidisc (Biotec). Los resultados se expresaron como la diferencia de porcentaje entre las muestras con células solas y las muestras en contacto con el biomaterial de la invención.

40

[0141] El ensayo de daño de ADN evalúa la posible genotoxicidad del biomaterial mediante la detección de la presencia de Ser₁₃₉ fosforilada en la histona H2AX. La fosforilación se induce mediante la presencia de rupturas en la doble hélice de ADN mediante inmunofluorescencia. Las células se sembraron con una densidad inicial de 6000 células/cm² durante 24 horas, 3000 células/cm² durante 120 horas, y 1500 células/cm² durante 120 horas. El medio de cultivo se cambió en el día 3. Se usaron células tratadas con 200 mM de H₂O₂ durante 16 horas como control positivo. Al final del experimento, las células se fijaron con paraformaldehído al 4 % (Sigma-Aldrich), seguido de permeabilización con solución salina tamponada con fosfato (PBS) que contenía un 0,1 % de BSA (albúmina de suero bovino) con un 0,25 % de Triton X-100. Los sitios de reacción no específicos se bloquearon mediante la incubación con tampón de bloqueo (0,1 % de BSA en PBS). Posteriormente, se incubó un anticuerpo anti-yH2AX durante 1 hora, y se reveló a través de un anticuerpo de cabra secundario Alexa Fluor® 555 IgG anti-ratón. Los núcleos celulares se marcaron con Hoechst 33342. Las placas se examinaron con un microscopio de fluorescencia LeicaDMI4000B (Leica Microsystems) a 20x. El número medio de células positivas con daño de ADN se determinó mediante la observación de 3-5 campos independientes para cada repetición biológica y para cada condición experimental.

45

[0142] La Figura 11 muestra las curvas de crecimiento celular, expresadas como el porcentaje de crecimiento de control. A las 24 horas, los fibroblastos humanos muestran un grado de proliferación similar al de las células sembradas en el pocillo de control (sustrato de poliestireno). A las 72 horas, se observó una ligera disminución en las curvas de crecimiento de las células en contacto con los tres parches SF (microfibras, nanofibras e híbrido micro/nano), que se recuperó inmediatamente a las 120 horas. Se puede concluir que la tasa de proliferación de fibroblastos humanos no se ve alterada por la presencia de los tres parches SF diferentes.

50

[0143] Las células endoteliales humanas en contacto con los tres biomateriales SF mostraron una disminución en el grado de proliferación y comparación con el control. Conviene observar que, al igual que el ensayo con fibroblastos humanos, los tres biomateriales SF mostraron casi la misma tendencia en términos de proliferación celular hasta las 72 horas. Sin embargo, con células endoteliales humanas a 120 horas con el parche nanofibroso se mostró una

5 disminución adicional de la curva mientras que los parches híbridos micro/nanofibrosos presentaron un aumento en la actividad metabólica medida de las células, que está directamente relacionado con la proliferación celular.

[0144] Los resultados del ensayo de genotoxicidad (Figura 12) para fibroblastos humanos mostraron un aumento en el grado de fosforilación de H2AX después de 72 horas de incubación. Este resultado está de acuerdo con la

10 tendencia del ensayo de proliferación Alamar Blue®, que mostró una ligera disminución en la actividad metabólica de las células para el mismo tiempo de incubación, probablemente atribuible a una fase de adaptación de las células cultivadas en biomateriales SF. A las 24 y 120 horas, los fibroblastos humanos cultivados en los tres biomateriales SF mostraron niveles significativamente inferiores de fosforilación en comparación con las células de control

15 cultivadas en poliestireno, lo que sugiere que los tres parches SF son menos genotóxicos frente a estas células que el sustrato de control. Como ya se ha observado con el ensayo Alamar Blue®, las células endoteliales humanas se comportan de modo diferente a los fibroblastos humanos: solo el sustrato de microfibra induce un aumento en la forma fosforilada de H2AX a las 24 y 120 horas, lo que indica un efecto genotóxico ligeramente mayor de este parche SF en comparación con el sustrato de control. Por otra parte, el parche nanofibroso y, de forma más importante, el parche híbrido micro/nanofibroso presenta daño de ADN en un menor grado, lo que indica una mejor

20 biocompatibilidad en términos de genotoxicidad frente a este tipo de células humanas.

COMENTARIOS A LOS RESULTADOS

[0145] Como se ha demostrado mediante los ensayos anteriores, los materiales compuestos de la presente

25 invención tienen propiedades que reproducen en parte las de las nano y microfibras separadas, pero también nuevas características que resultan del acoplamiento de los dos tipos de fibra (ensayos dinamométricos, FTIR y DSC).

[0146] Los resultados de los análisis químicos muestran que la estructura híbrida tiene básicamente la misma

30 composición de aminoácidos de las partes microfibrosa y nanofibrosa de partida, caracterizada por la presencia de grandes cantidades de solo 4 aminoácidos (glicina + alanina + serina + tirosina = 89 % en moles), mientras que los demás aminoácidos están presentes en pequeñas cantidades (aproximadamente un 11 % en moles total). Se puede concluir que el proceso de acoplamiento no modifica la estructura química de la fibroína y que las propiedades

35 quimiotácticas biológicas del polímero permanecen por lo tanto sin cambios incluso después del acoplamiento.

[0147] Además, en comparación con los materiales de la técnica anterior, los materiales de la invención presentan

mejor adhesión y un comportamiento más consistente en los ensayos mecánicos.

[0148] En particular, las imágenes de SEM de las estructuras híbridas de la invención (Figuras 2 y 3) muestran una

40 buena adhesión entre las partes y la presencia de una película de polímero continua entre las fibras de las dos partes iguales, mientras que las imágenes similares de las estructuras más cercanas a la técnica anterior (documento de solicitud de Patente CN 101879330 A, Figura 4) muestran una película de polímero, que garantizaría la adhesión entre las partes, que está fragmentada y está adherida a solo una de estas.

[0149] Los ensayos de tracción mostraron que el material compuesto de la invención tiene características únicas en

45 el área de elongación entre aproximadamente un 10 y un 25 %, debido específicamente a las interacciones entre los dos tipos de fibras. Por el contrario, el material acoplado de la técnica anterior muestra un comportamiento que es la suma pura de los comportamientos de los componentes nano y microfibrosos (Figura 8-B), lo que demuestra que los micro y nanocomponentes acoplados conjuntamente por medio de material poroso se comportan como fases

50 separadas, reteniendo cada uno sus propiedades inherentes, sin mostrar ningún cambio/mejora causado por la técnica de acoplamiento; en su lugar, mediante la producción de una estructura híbrida de acuerdo con la técnica más cercana a la anterior, se obtiene un empeoramiento de las propiedades de tracción del componente microfibroso, cambiando de valores de carga y elongación en la ruptura de aproximadamente 63 N y un 48 % a valores de 40 N y un 30 %, respectivamente.

[0150] De forma similar, los ensayos de pelado dinamométricos de las dos capas de las estructuras híbridas

55 confirmó una resistencia de adhesión mucho mayor entre las partes nano y microfibrosas en el caso de la presente invención que en el caso de la técnica anterior (Figura 10).

[0151] Por lo tanto, el proceso de la técnica anterior no garantiza las mismas características de continuidad entre las

60 dos partes de la estructura híbrida final obtenida con el proceso de la presente invención: en el caso de dispositivos fabricados de acuerdo con la técnica anterior, esto puede conducir a la producción de discontinuidades morfológicas y mecánicas entre las diferentes capas, dando como resultado la pérdida del rendimiento y de las características geométricas, hasta la deformación por fluencia y/o el colapso de las capas más débiles (por ejemplo, nanofibras)

65 desde el punto de vista mecánico. En condiciones de uso con estrés desde el punto de vista mecánico y biológico, tales como las que se pueden producir en la evolución de un implante *in vivo*, el diferente comportamiento de las dos

o más fases de polímero que componen la estructura híbrida de la técnica anterior podrían crear estrés local de una magnitud tal que interfiera con el proceso regenerativo en curso, especialmente si el material se expone a flujos de fluidos fisiológicos.

- 5 **[0152]** Las estructuras híbridas de la invención mostraron un mejor comportamiento biológico *in vitro* que las partes individuales de fibroína microfibrada y de fibroína nanofibrada mejorando adicionalmente, desde el punto de vista de comportamiento biológico, los ya buenos niveles de rendimiento de las partes micro y nanofibradas tomadas por separado: se ha descrito el rendimiento de andamiaje de la microfibrada sola, por ejemplo, en el artículo "De novo engineering of reticular connective tissue *in vivo* by silk fibroin nonwoven materials", Dal Pra *et al.*, Biomaterials (2005) 26 1987.
- 10

REIVINDICACIONES

1. Proceso para la producción de una estructura híbrida hecha de microfibras y nanofibras de fibroína de seda acopladas entre sí, que comprende las siguientes etapas:

- 5 a) preparación de una o más partes hechas de fibroína microfibrosa;
 b) preparación de una o más partes hechas de fibroína nanofibrosa;
 c) tratamiento de dichas una o más partes de fibroína nanofibrosa y de dichas una o más partes de fibroína microfibrosa, por separado o después de acoplamiento, con un disolvente para fibroína y/o con una solución que
 10 comprende fibroína disuelta en un disolvente;
 c') si en la etapa c) las partes nanofibrasas y microfibrasas se han tratado por separado con un disolvente para fibroína y/o con una solución que comprende fibroína disuelta en un disolvente, acoplamiento de dichas partes;
 d) consolidación de la estructura microfibrosa/nanofibrosa híbrida obtenida en la etapa c) o en la etapa c') por
 15 tratamiento térmico a una temperatura entre 10 °C y 150 °C, durante un tiempo entre 1 minuto y 24 horas;
 e) retirada del disolvente por lavado con agua o una mezcla de agua-alcohol a una temperatura entre 10 °C y 100 °C, o por evaporación a una temperatura entre 10 °C y 100 °C, posiblemente al vacío,

en el que el disolvente usado en la etapa c) se selecciona entre ácido fórmico, 1,1,1,3,3,3-hexafluoro-2-propanol, ácido trifluoroacético, hexafluoroacetona, N-óxido de N-metilmorfolina, líquidos iónicos, mezclas de cloruro de calcio-etanol-agua, mezclas de nitrato de calcio-metanol-agua, soluciones acuosas de sales de litio y las mezclas entre
 20 estos disolventes y/o con agua.

2. El proceso de acuerdo con la reivindicación 1, que comprende además las siguientes etapas:

- 25 f) acoplamiento de dos o más estructuras híbridas producidas de acuerdo con la reivindicación 1, para obtener una estructura híbrida jerárquicamente superior;
 g) repetición de las etapas c) a e) de la reivindicación 1 con dicha estructura híbrida jerárquicamente superior.

3. El proceso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 o 2, en el que la etapa a) se lleva a cabo usando como material de partida fibroína microfibrosa en forma de un hilo de seda que tiene un recuento entre
 30 10 den y 400 den, descruceado previamente o posteriormente a la producción de dichas una o más partes de fibroína microfibrosa, y en el que dichas una o más partes de fibroína microfibrosa se producen con una técnica seleccionada entre tejido de trama-urdimbre, tricotado, trenzado, devanado de filamentos y una técnica de producción de tela no tejida.

4. El proceso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que la etapa b) se lleva a cabo mediante hilado forzado o electrohilado de una solución de fibroína en un disolvente seleccionado entre ácido fórmico, 1,1,1,3,3,3-hexafluoro-2-propanol, ácido trifluoroacético, líquidos iónicos, y las mezclas entre estos
 40 disolventes y/o con agua, en el que la concentración de fibroína está entre un 1 % p/v y un 30 % p/v en el caso en que el disolvente sea ácido fórmico, y entre un 5 % p/v y un 40 % p/v en el caso en que se empleen uno o más de dichos disolventes diferentes del ácido fórmico.

5. El proceso de acuerdo con la reivindicación 4, en el que dicho disolvente es un líquido iónico seleccionado entre cloruro de 1-etil-3-metilimidazolio, cloruro de 1-butil-3-metilimidazolio, acetato de 1-etil-3-metilimidazolio y 1-etil-3-metilimidazolio glicina.
 45

6. El proceso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 4 o 5, en el que dichas una o más partes de fibroína nanofibrosa se producen mediante electrohilado, mediante el uso de una hiladora con una boquilla de un diámetro entre 0,01 mm y 10 mm, una distancia entre dicha boquilla y un colector de nanofibras entre 5 cm y 60 cm,
 50 y una diferencia de potencial entre dicha boquilla y el colector entre 5 kV y 100 kV.

7. El proceso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 4 a 6, en el que a la solución de partida para la producción de dichas una o más partes de fibroína nanofibrosa se añaden uno o más agentes bioactivos seleccionados entre factores de crecimiento, fármacos, células, antibióticos, antivirales, enzimas y vitaminas.
 55

8. El proceso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que la etapa c) se lleva a cabo por tratamiento de una o más de dichas partes solo con disolvente, mediante:

- 60 - inmersión de dichas una o más partes en el disolvente durante un tiempo entre 1 segundo y 240 minutos; o
 - deposición del disolvente por vertido, revestimiento, pulverización, electropulverización o electrohilado, en una cantidad entre 0,001 y 0,5 ml por cm² de la superficie de dichas una o más partes; o
 - exposición de dichas una o más partes a vapores del disolvente durante un tiempo entre 1 segundo y 120 minutos;

65 operando a una temperatura entre 40 y 80 °C en el caso de partes hechas con microfibras y entre la temperatura ambiente y 70 °C en el caso de partes hechas con nanofibras.

9. El proceso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, en el que en la etapa c) se lleva a cabo por tratamiento de una o más de dichas partes con una solución de fibroína en un disolvente, mediante:

- 5
- inmersión de dichas una o más partes en la solución durante un tiempo entre 1 segundo y 240 minutos; o
 - deposición de la solución por vertido, revestimiento, pulverización, electropulverización o electrohilado, en una cantidad entre 0,001 y 100 ml por 1 cm² de superficie de dichas una o más partes,

operando a una temperatura entre 40 y 80 °C en el caso de partes hechas con microfibras y entre la temperatura ambiente y 70 °C en el caso de partes hechas a partir de nanofibras.

10

10. El proceso de acuerdo con la reivindicación 9, en el que dicha solución contiene entre un 1 y un 30 % p/v de fibroína en ácido fórmico, o entre un 5 % y un 40 % p/v de fibroína en uno o más disolventes seleccionados entre cloruro de 1-etil-3-metilimidazolio, cloruro de 1-butil-3-metilimidazolio, acetato de 1-etil-3-metilimidazolio o 1-etil-3-metilimidazolio glicina, puros o en una mezcla que contiene entre un 5 % y un 50 % p/p de agua.

15

11. Dispositivo médico implantable que comprende una estructura híbrida que consiste en microfibras y nanofibras de fibroína de seda acopladas obtenida de acuerdo con el proceso de una cualquiera de las reivindicaciones precedentes.

20

12. Dispositivo médico de acuerdo con la reivindicación 11, en el que las partes de fibroína microfibrosa y/o fibroína nanofibrosa se funcionalizan con uno o más agentes bioactivos seleccionados entre factores de crecimiento, fármacos, antibióticos, antivirales, enzimas y vitaminas.

25

13. Dispositivo médico implantable de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 11 o 12 para su uso en la contención de hernias y prolapsos o como andamio para la regeneración de tejidos y órganos del sistema nervioso periférico (nervios periféricos), el sistema vascular (venas, arterias, fístulas arteriovenosas para acceso vascular), el sistema cardiovascular (arterias coronarias y músculo cardíaco), el sistema nervioso central (espina dorsal), la piel y sus capas, los tejidos de contención y protección de órganos internos (duramadre, pericardio, pleura, peritoneo, etc.) y los tejidos del sistema musculoesquelético (tendones, ligamentos, músculos).

30

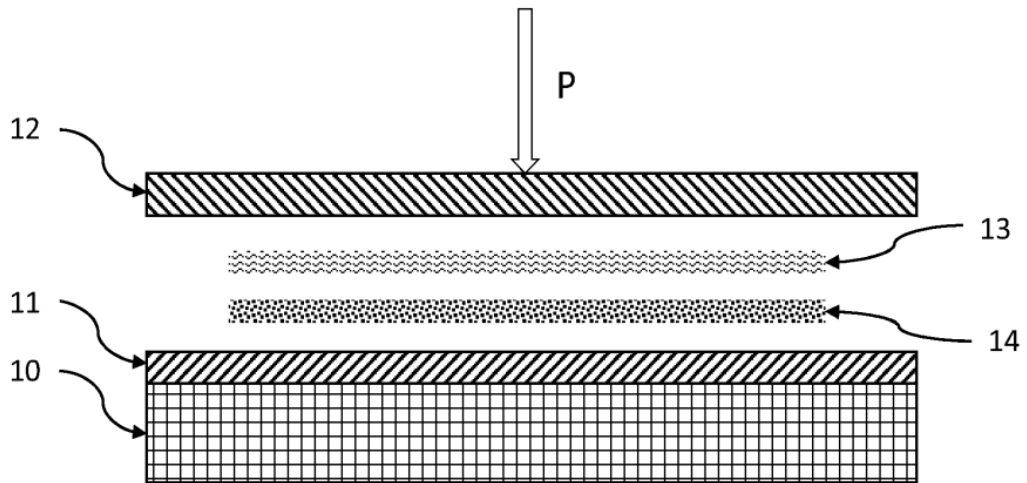


Fig. 1

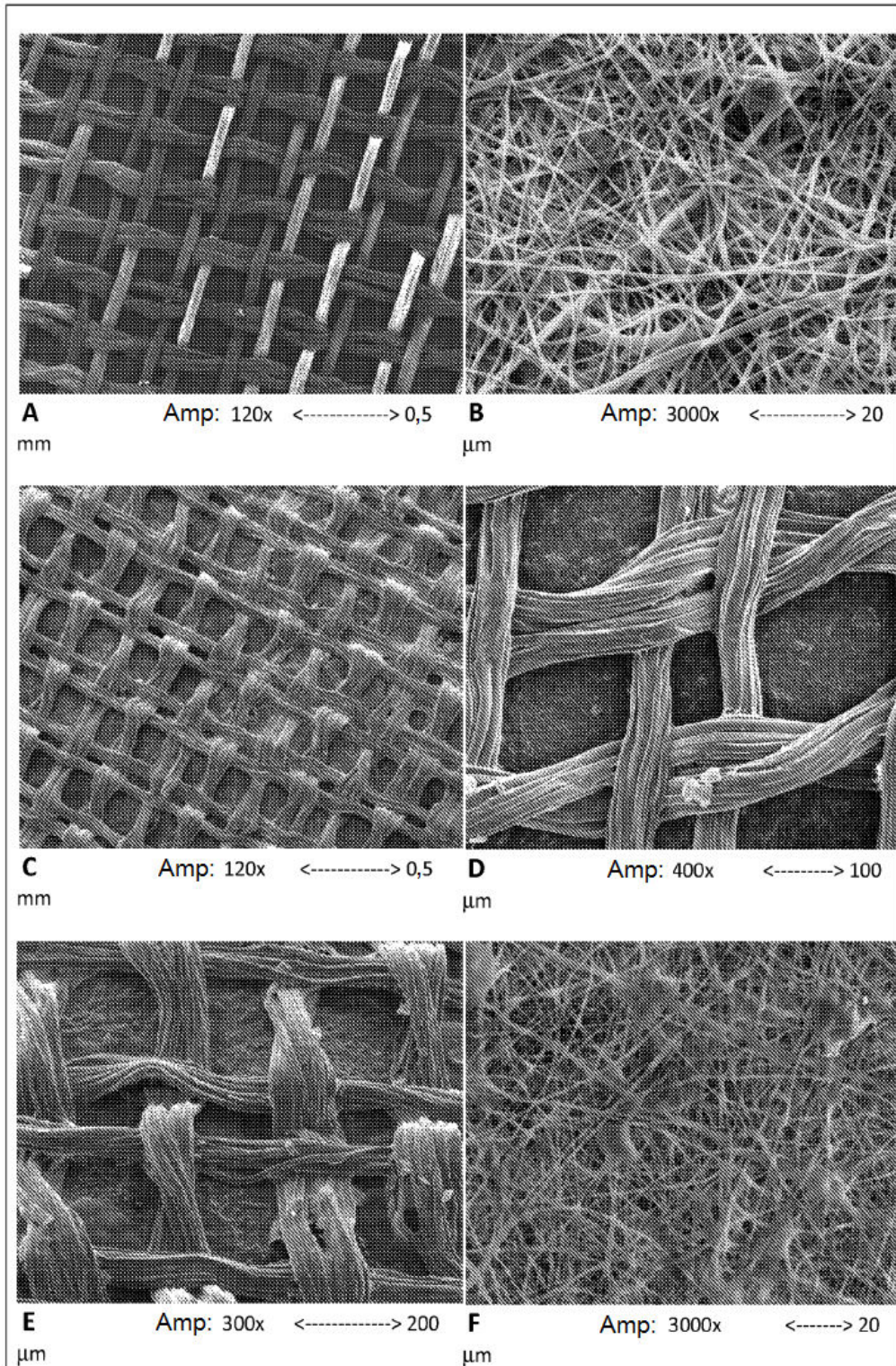


Fig. 2

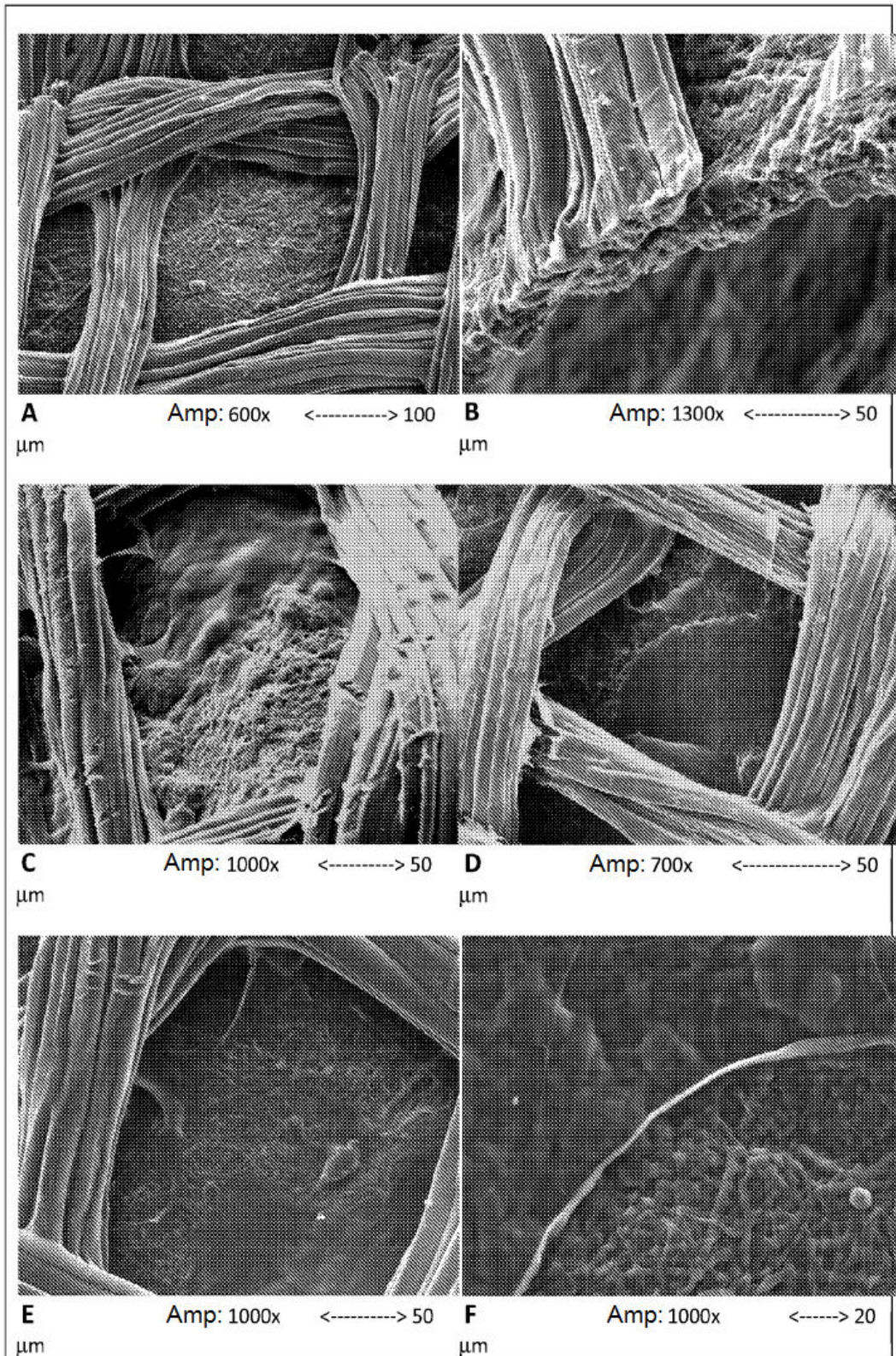


Fig. 3

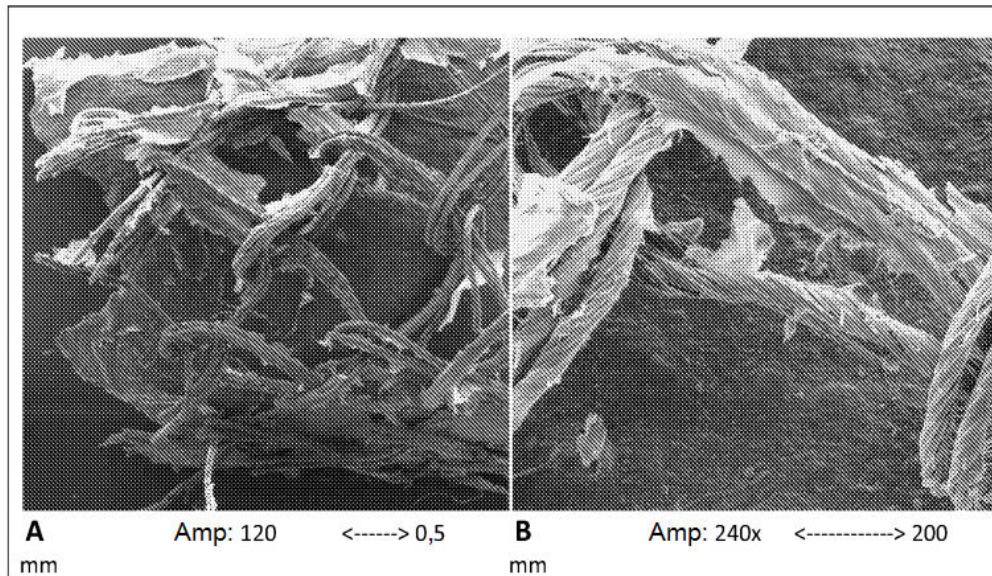


Fig. 4

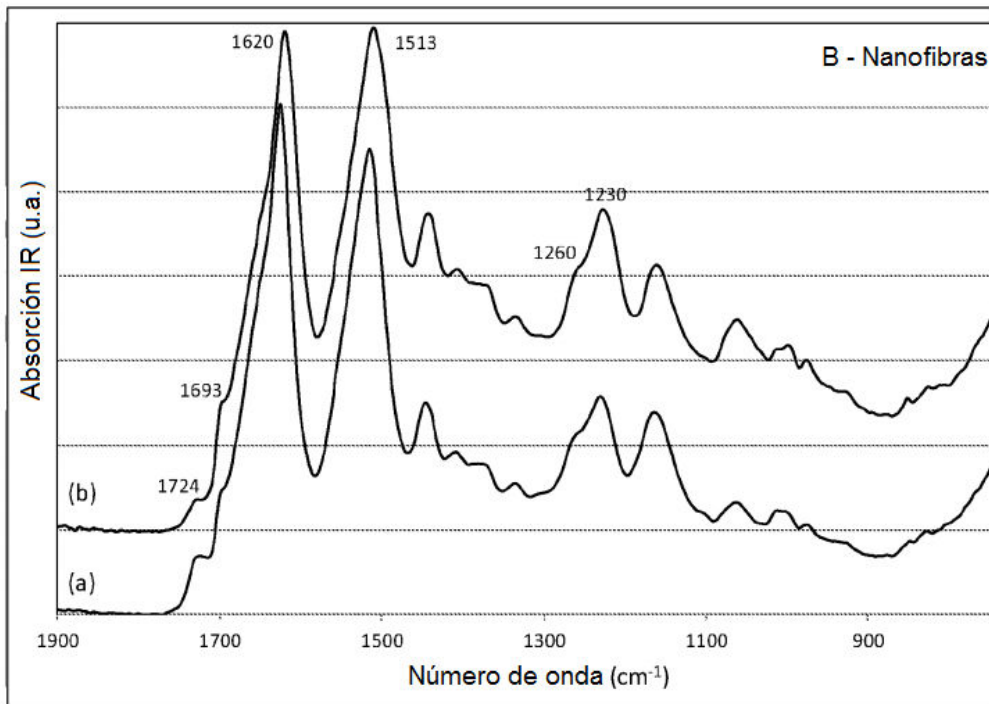
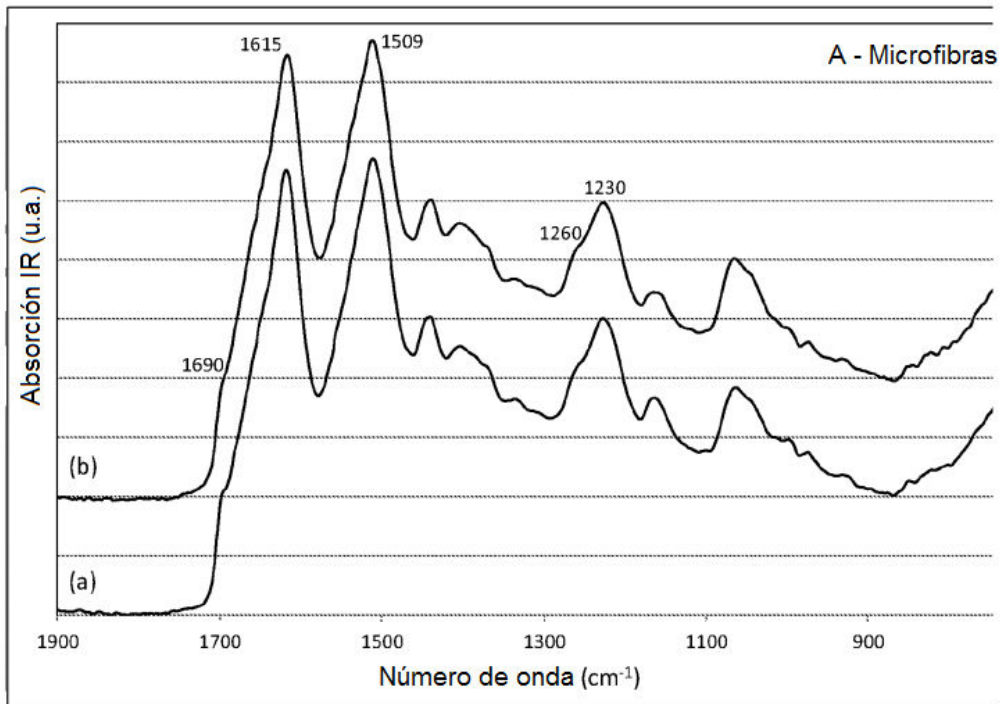


Fig. 5

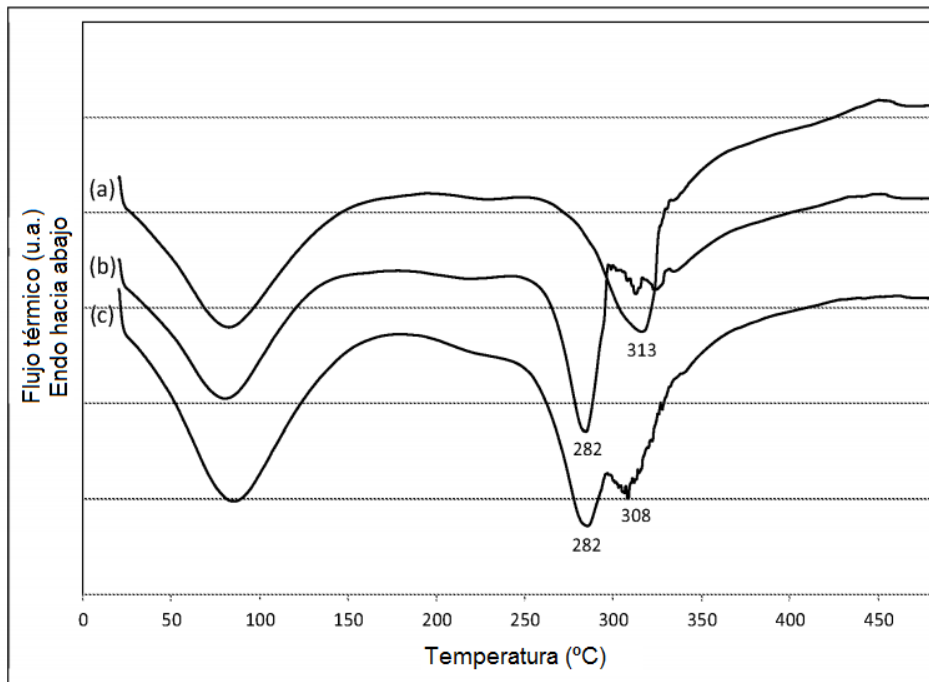


Fig. 6

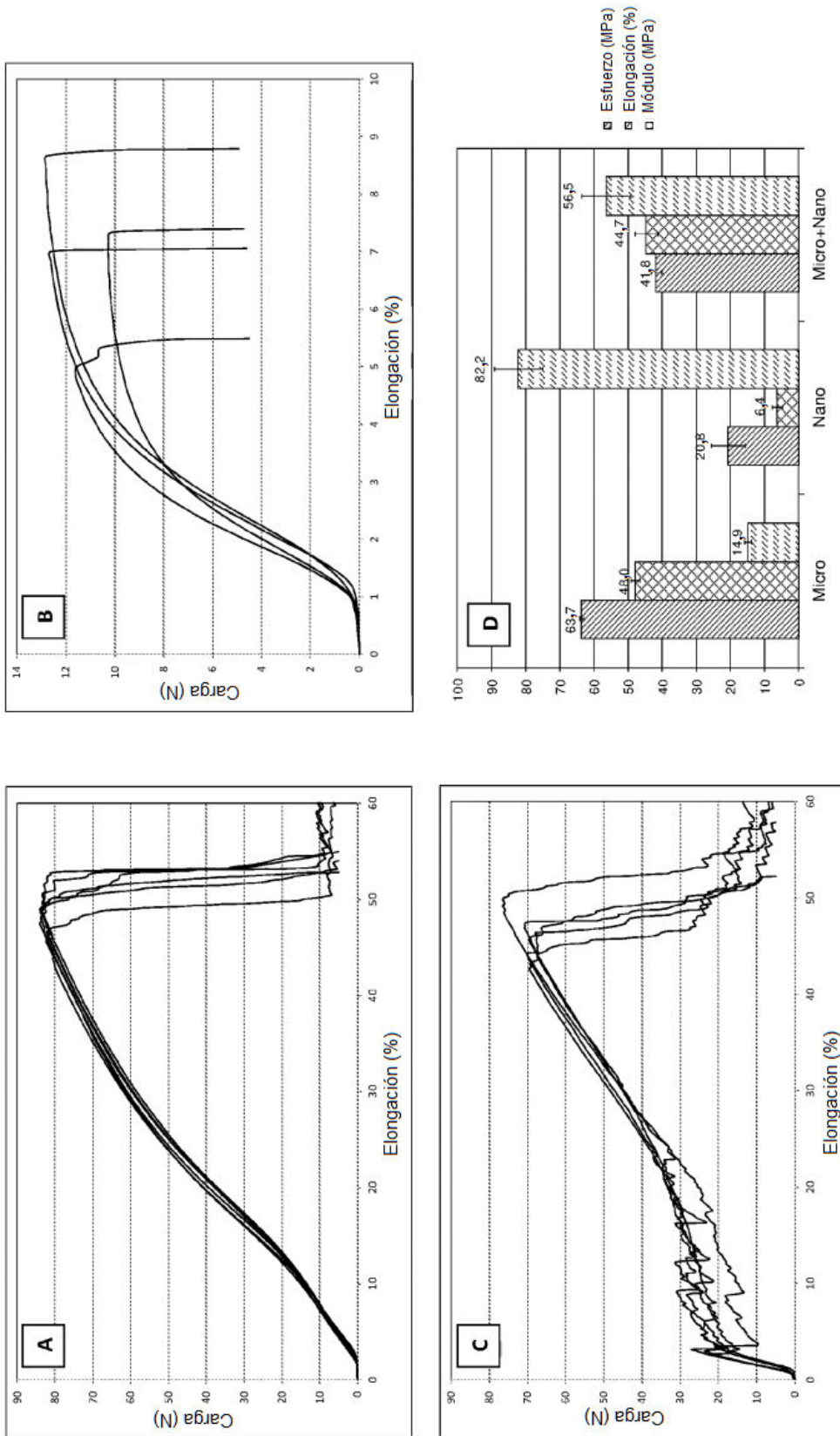


Fig. 7

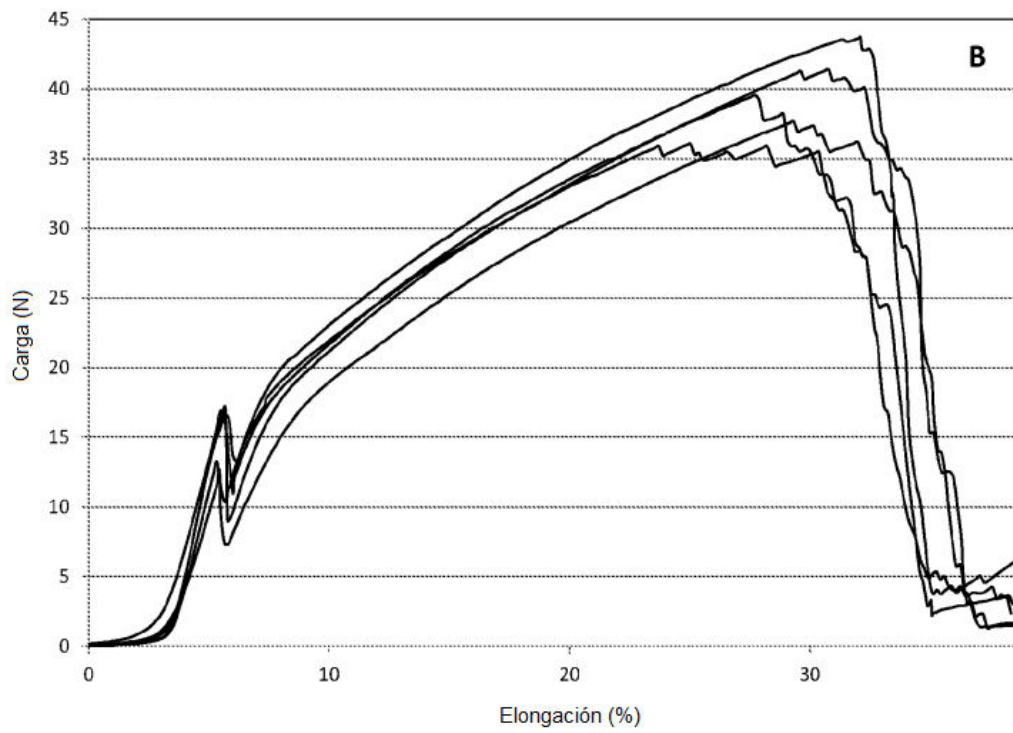
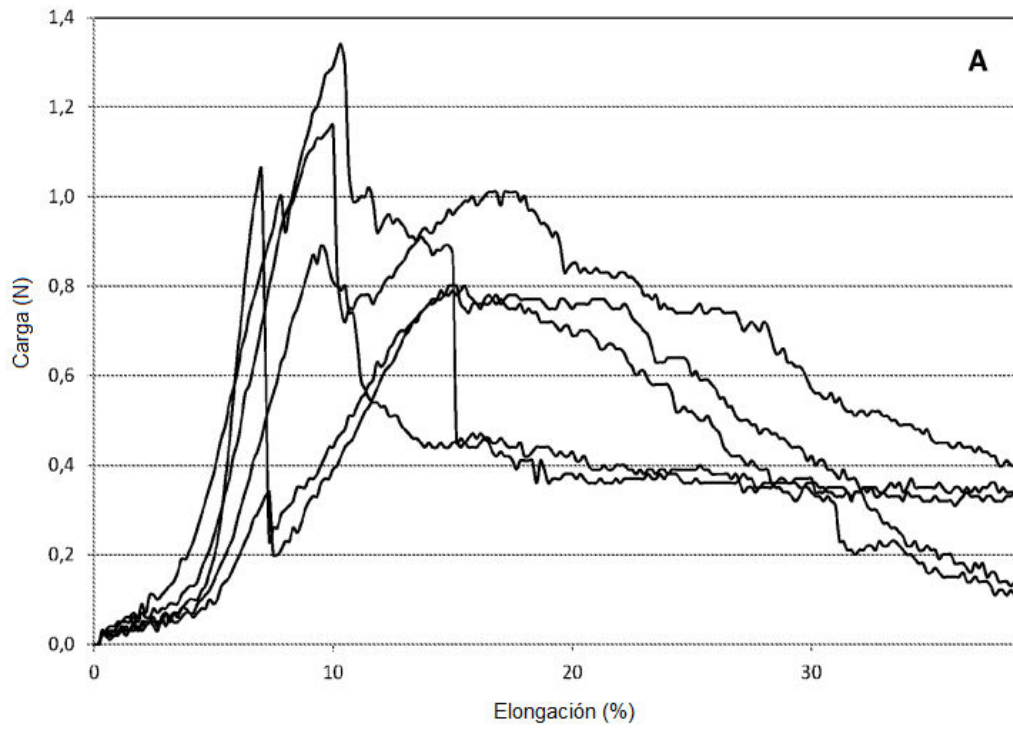


Fig. 8

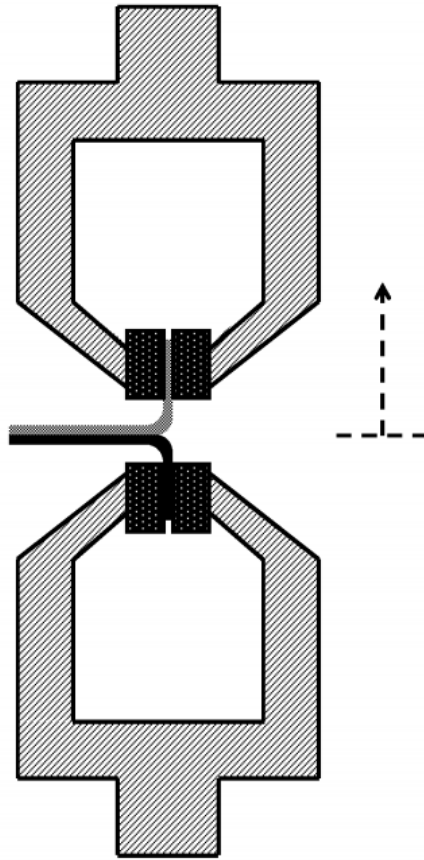


Fig. 9

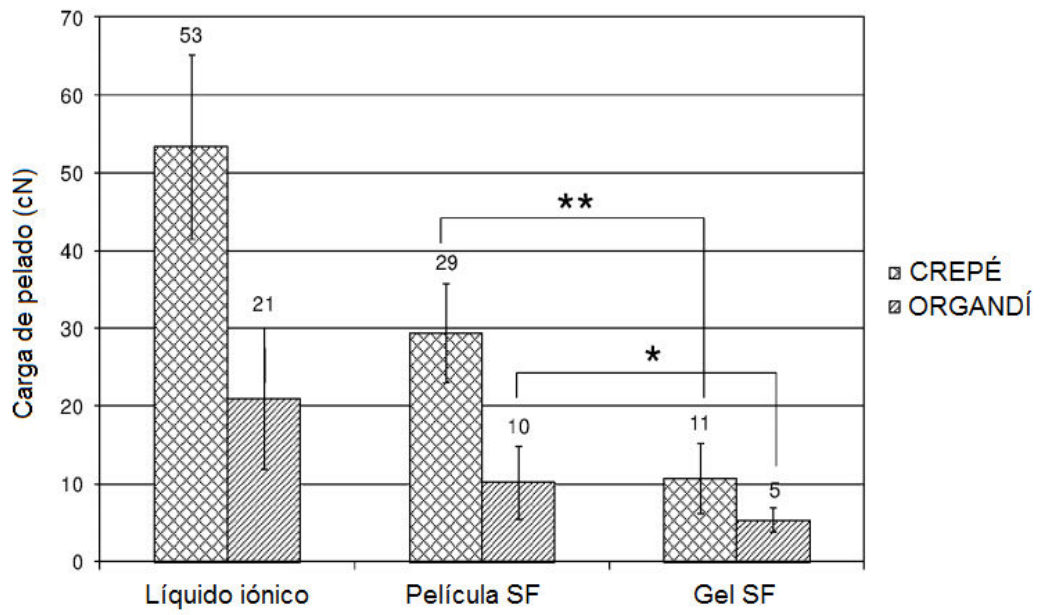
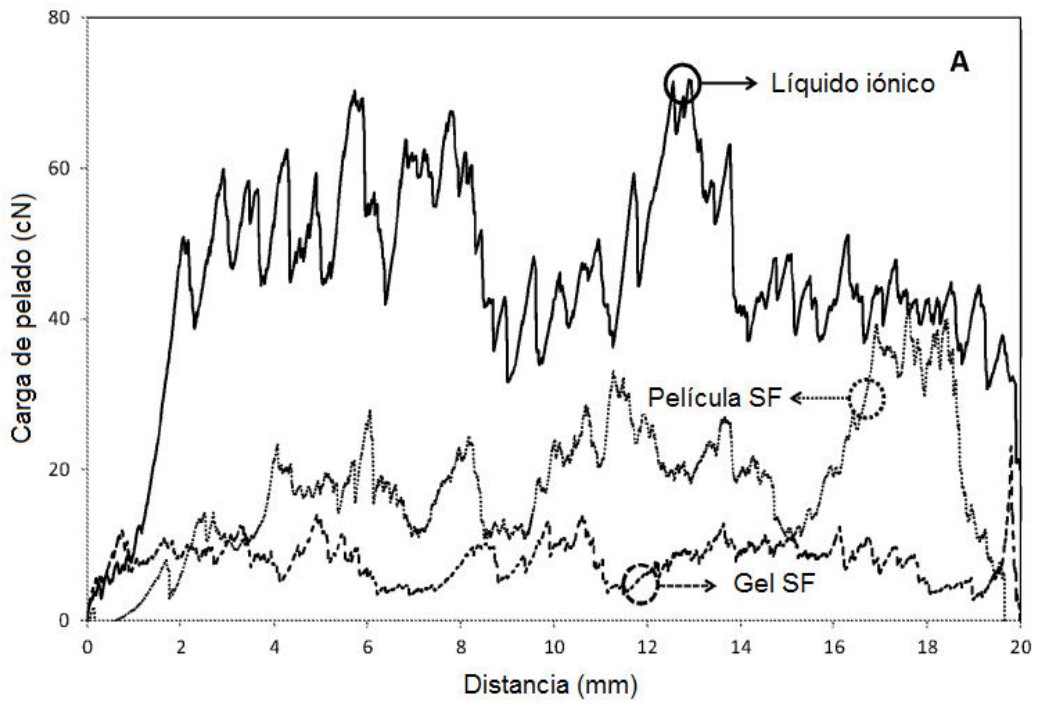


Fig. 10

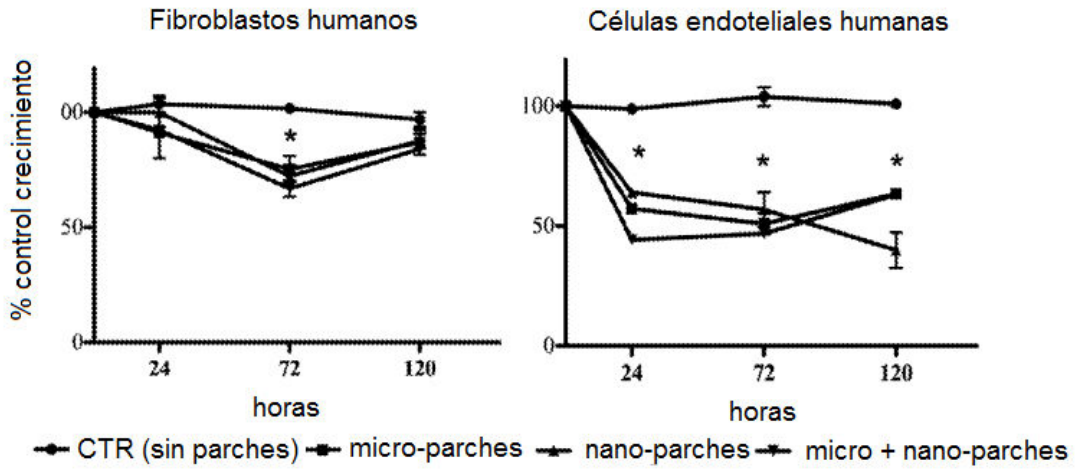


Fig. 11

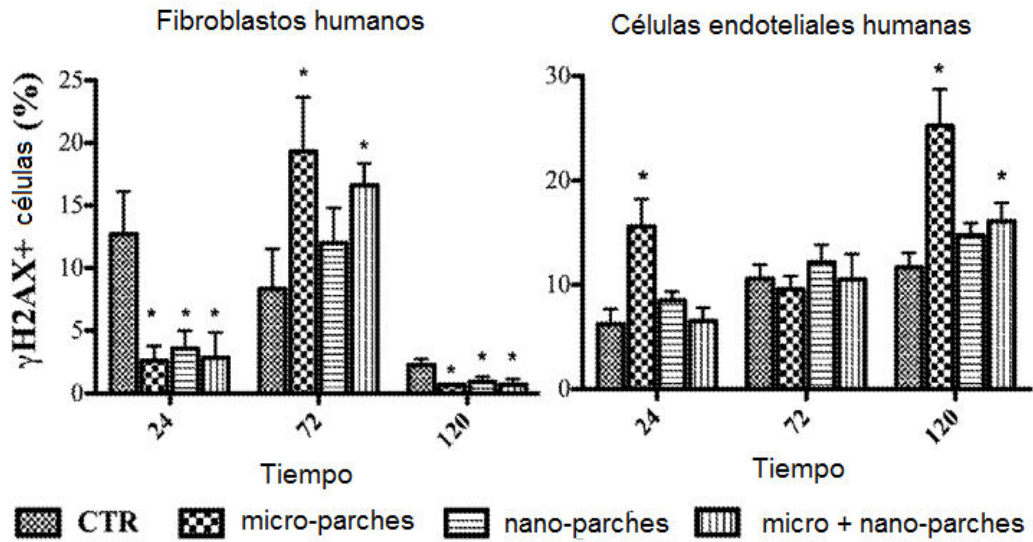


Fig. 12