

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 781 114**

51 Int. Cl.:

**A61K 35/64** (2015.01)

**A23J 3/00** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **20.08.2015 PCT/US2015/046141**

87 Fecha y número de publicación internacional: **25.02.2016 WO16029034**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **20.08.2015 E 15833824 (4)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **08.01.2020 EP 3182985**

54 Título: **Composición proteica derivada de fibroína**

30 Prioridad:

**20.08.2014 US 201462039675 P**  
**17.07.2015 US 201562193790 P**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:  
**28.08.2020**

73 Titular/es:

**SILK TECHNOLOGIES LTD. (100.0%)**  
**3700 Annapolis Lane North, Suite 105**  
**Plymouth, MN 55447, US**

72 Inventor/es:

**LAWRENCE, BRIAN D. y**  
**INFANGER, DAVID W.**

74 Agente/Representante:

**INGENIAS CREACIONES, SIGNOS E**  
**INVENCIONES, SLP**

**ES 2 781 114 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

Composición proteica derivada de fibroína

5 **Antecedentes de la invención**

La fibra de seda y las proteínas secretadas por el gusano de seda domesticado *Bombyx mori* se han utilizado durante siglos en la industria textil. Las proteínas secretadas se han utilizado más recientemente como un biomaterial para aplicaciones biomédicas, incluso como un componente estructural y como una solución proteica. De forma natural, las proteínas del gusano de seda se encuentran como una amalgama de las proteínas de seda fibroína y sericina, en las que la sericina sirve como una sustancia pegajosa que se une a la fibroína y mantiene la forma de la crisálida. La eliminación de la sericina, tal como mediante una extracción mediada por detergente o en un lavado a temperatura elevada y altamente alcalino, da como resultado fibras de fibroína libres de sericina que incluyen proteínas de fibroína de cadenas pesada y ligera asociadas mediante un enlace disulfuro sencillo. La conversión de estas fibrillas en proteína de fibroína de seda soluble en agua requiere la adición de una sal pesada concentrada (por ejemplo, bromuro de litio 8-10M), que interfiere con enlaces iónicos inter- e intramoleculares y puentes de hidrógeno que de lo contrario, convertirían la proteína de fibroína en insoluble en agua.

Las aplicaciones de las proteínas de fibroína de seda típicamente requieren la eliminación de las concentraciones elevadas de sales de LiBr, tales como mediante el uso de diálisis, de modo que las sales no interfieran con la función adecuada del material en un medio dado. Sin estas sales que compiten con enlaces iónicos y puentes de hidrógeno de la fibroína de seda solubilizada, las soluciones de proteína de fibroína de seda son relativamente inestables, son vulnerables a la agregación de proteínas y a menudo precipitan fuera de las soluciones acuosas. Se piensa que la agregación sucede a través de interacciones entre proteínas de fibroína y a continuación, la gelificación subsiguiente del material, impulsada a través de la formación de estructuras secundarias de proteína de láminas beta entre los motivos de aminoácidos hidrófobos de las cadenas pesadas de fibroína. Tras la formación de estas estructuras, la transición desde la solución de fibroína soluble a gel de fibroína insoluble es rápida y en gran medida irreversible, limitando así la aplicación de la solución para aplicaciones basadas en soluciones acuosas, debido a la limitada vida útil del material.

Para la combatir la propensión a la gelificación de la fibroína acuosa, se han realizado intentos para minimizar la agregación de proteínas y la formación de láminas beta subsiguiente. La disminución de la concentración de fibroína en solución es una aproximación coligativa dirigida a atenuar las interacciones proteína-proteína, que precede a la formación de estas estructuras, con todo podría resultar una solución de fibroína que está demasiado diluida para aplicaciones relevantes de proteínas. Como alternativa, las modificaciones de la solución acuosa que impedirían la agregación de proteínas y/o la formación de láminas beta (por ejemplo, pH de la solución, adición de excipientes estabilizadores) podrían prevenir estos eventos. Sin embargo, estas modificaciones y adiciones químicas pueden limitar las aplicaciones derivadas incrementando la toxicidad biológica o introduciendo agentes incompatibles en la solución. Por consiguiente, se necesita un material de proteínas derivadas de la seda (PDS; en inglés, SDP) que sea resistente a la agregación y que tenga perfil de estabilidad de vida útil dentro de diferentes industrias.

Una estrategia nueva para eliminar las vulnerabilidades mencionadas anteriormente de la fibroína de seda acuosa es modificar la estructura bioquímica y las cualidades de la proteína de fibroína de seda en sí mismas, más que el medio de solución acuoso. A tal fin, las modificaciones sobre el proceso de extracción de fibra de seda y/o las condiciones implicadas en la producción de fibroína de seda acuosa pueden tener un impacto sobre la secuencia primaria de aminoácidos y por tanto, la química responsable de la agregación de proteínas y la formación de láminas beta. Como tal, el desarrollo de un proceso para modificar los materiales de fibroína de seda podría ampliar drásticamente la estabilidad y la vida útil de un producto de solución de seda.

El documento US2012040907 desvela un material bioactivo que se hizo utilizando soluciones de fibroína y suspensiones diseñadas para soportar las construcciones, reparación, regeneración o aumento de hueso y otros tejidos del cuerpo. Sus soluciones de fibroína, suspensiones y compuestos pueden inyectarse para rellenar cavidades o reemplazar tejido perdido. Después de la inyección, los materiales pueden producir un esqueleto capaz de promover la regeneración tisular mientras se degradan.

**Resumen**

La invención proporciona una composición proteica derivada de fibroína de seda. La composición posee intrínsecamente una solubilidad y una estabilidad potenciadas en soluciones acuosas. En una realización, la invención proporciona una composición de proteína preparada mediante un proceso que comprende calentar una solución acuosa de fibroína a una presión elevada. La solución de fibroína acuosa incluye el bromuro de litio a una concentración de al menos 8M. La solución acuosa de fibroína se calienta a al menos aproximadamente 105 °C (221 °F) bajo una presión de al menos aproximadamente 68,95 kPa (10 PSI) durante al menos aproximadamente 20 minutos, para proporcionar la composición proteica. Los polipéptidos de la composición proteica comprenden menos del 8,5 % de restos de aminoácidos de serina y la composición proteica tiene una viscosidad acuosa de menos de 5 mPa\*s (5 cP) como un 10 % p/p de solución en agua.

En otras realizaciones, la invención proporciona una composición proteica preparada mediante un proceso que comprende calentar una solución acuosa de fibroína a una presión elevada, en la que la solución acuosa de fibroína comprende bromuro de litio a una concentración de 9-10M y en la que la solución acuosa de fibroína se calienta a una temperatura en el intervalo de aproximadamente 115 °C (239 °F) a aproximadamente 125 °C (257 °F), bajo una presión de aproximadamente 96,53 kPa (14 PSI) a aproximadamente 137,90 kPa (20 PSI) durante al menos aproximadamente 20 minutos; para proporcionar la composición proteica. La composición proteica incluye menos del 6,5 % de restos de aminoácidos de serina y la composición proteica tiene una viscosidad acuosa de menos de 10 mPa·s (10 cP) como un 15 % p/p de solución en agua.

La invención proporciona también una composición proteica derivada de fibroína que posee una estabilidad potenciada en solución acuosa, en la que: las secuencias de aminoácidos primarios de la composición proteica derivada de fibroína difieren de la fibroína natural, en al menos 4 % con respecto a la diferencia combinada en el contenido de serina, glicina y alanina; se reducen o eliminan los enlaces disulfuro de cisteína entre las cadenas de proteínas de fibroína pesada y de fibroína ligera; la composición comprende aminoácidos de glicina superiores al 46,5 % y aminoácidos de alanina superiores al 30 %; la composición tiene un contenido de serina que se reduce en más del 40 % en comparación con la proteína de fibroína natural, de modo que la composición comprende menos del 8 % de aminoácidos de serina; y en la que el peso molecular promedio de la proteína derivada de seda es menor de aproximadamente 100 kDa.

Se desvela una composición proteica derivada de fibroína que posee una estabilidad potenciada en solución acuosa, en la que: las secuencias de aminoácidos primarios de la composición proteica derivada de fibroína difieren de la fibroína natural por lo menos por lo menos el 6 % con respecto a la diferencia combinada en el contenido de serina, glicina y alanina; se reducen o eliminan los enlaces disulfuro de cisteína entre las cadenas de proteínas de fibroína pesada y de fibroína ligera; la composición tiene un contenido de serina que se reduce en más del 40 % en comparación con la proteína de fibroína natural; y en la que el peso molecular promedio de la proteína derivada de seda es menor de aproximadamente 96 kDa.

Se desvela una composición proteica derivada de fibroína que posee una estabilidad potenciada en soluciones acuosas, en la que: las secuencias de aminoácidos primarios de la composición proteica derivada de fibroína están modificadas respecto a la fibroína de seda natural; se reducen o eliminan los enlaces disulfuro de cisteína entre las cadenas de proteínas de fibroína pesada y de fibroína ligera; el peso molecular promedio de la proteína derivada de seda es menor de aproximadamente 100 kDa; y la composición proteica derivada de fibroína mantiene una absorbancia óptica a 550 nm de menos de 0,25 durante al menos dos horas después de cinco segundos de ultrasonificación.

Se desvela una composición proteica derivada de fibroína que posee una estabilidad potenciada en soluciones acuosas, en la que: las secuencias de aminoácidos primarios de la composición proteica derivada de fibroína están modificadas respecto a la fibroína de seda natural de manera que difieren de la fibroína natural por lo menos por lo menos el 5 % con respecto a la diferencia combinada en el contenido de serina, glicina y alanina; se reducen o eliminan los enlaces disulfuro de cisteína entre las cadenas de proteínas de fibroína pesada y de fibroína ligera; el peso molecular promedio de la proteína derivada de seda es menor de aproximadamente 96 kDa; y la composición proteica derivada de fibroína mantiene una absorbancia óptica a 550 nm de menos de 0,2 durante al menos dos horas después de cinco segundos de ultrasonificación.

Se puede aislar y/o purificar la composición proteica derivada de fibroína como un polvo seco o una película, por ejemplo, mediante diálisis y/o filtración. Como alternativa, se puede aislar y/o purificar la composición proteica derivada de fibroína como una solución acuosa estable, que puede modificarse para utilizar como una composición de alimentos o bebidas o como una formulación terapéutica, tal como una formulación oftálmica.

### Breve descripción de los dibujos

Los siguientes dibujos forman parte de la memoria descriptiva y se incluyen para demostrar adicionalmente ciertas realizaciones o diversos aspectos de la invención. En algunos casos, las realizaciones de la invención pueden entenderse mejor por referencia a los dibujos adjuntos en combinación con la descripción detallada presentada en este documento. La descripción y los dibujos adjuntos pueden resaltar un cierto ejemplo específico o un cierto aspecto de la invención. Sin embargo, el experto en la materia comprenderá que pueden utilizarse partes del ejemplo o aspecto en combinación con otros ejemplos o aspectos de la invención.

**Figura 1.** Diagrama de flujo que ilustra las etapas clave del procesamiento para la generación de tanto la solución de PDS como la solución de fibroína de seda de la técnica anterior. El proceso de producción de PDS contiene una etapa adicional (en el centro y en cursiva) para potenciar la estabilidad de la solución a lo largo del tiempo, que no se realiza durante el proceso de producción de la solución de fibroína de seda de la técnica anterior.

**Figura 2.** Foto que muestra la prueba de estabilidad de Lawrence para una solución estable de PDS (Muestra 1, a la izquierda, producida mediante el proceso descrito en el Ejemplo 1) y una solución de fibroína de seda de la

técnica anterior (Muestra 2, a la derecha, producida mediante condiciones de hidrólisis estándar). La inspección visual revela que la Muestra 1 es una solución acuosa estable que no ha gelificado, mientras que la Muestra 2 ha gelificado y por tanto, no es una solución acuosa estable.

**Figura 3.** Foto de un gel que muestra modificación mediada por procedimiento de proteína de fibroína acuosa de seda de solución de PDS. La foto muestra la distribución del peso molecular (PM) de una solución de PDS (Carril 3, autoclavada) frente a una solución de fibroína de seda de la técnica anterior (Carril 2, no autoclavada). Se proporciona una escala estándar de proteína (Carril 1) y sus pesos asociados (números a la izquierda del Carril 1) como referencia de PM. Es notable una banda de PM prominente en los 23-26 kDa en el Carril 2 y que está ausente totalmente después del proceso de autoclavado, indicando que la degradación de la cadena ligera de fibroína contribuye a la estabilidad potenciada del material de proteína PDS. Se observa también un cambio claro en el intervalo de PM de la proteína de fibroína después del autoclavado (Carril 3), indicando una modificación de la proteína de fibroína de seda hacia la composición de material de PDS.

**Figura 4A-B.** Imágenes que demuestran que (A) el material de solución PDS no gelifica, mientras que (B) el material de solución de fibroína de seda de la técnica anterior gelifica dentro de las 2 horas siguientes a la ultrasonificación.

**Figura 5.** Impacto del procesamiento de la fibroína como se describe en el presente documento sobre la estabilidad y la viscosidad de la solución de proteínas. Gráfico resumen que ilustra la viscosidad de la solución como una función de la concentración de proteínas en la fibroína de seda de la técnica anterior (FSTA; en inglés, PASF), FSTA calentada a 107 °C (225 °F) durante 30 minutos (FSTA-225 °F) y PDS. PASF y PASF-225 °F demostraron un aumento brusco en la viscosidad en las soluciones >75 mg/g (7,5 % p/p) y no se pudieron concentrar más de 200 mg/g sin proteínas cayéndose de la solución. Por contra, la PDS mantuvo una viscosidad baja a lo largo de todas las concentraciones y consiguió estar concentrada a niveles que exceden los 240 mg/g.

**Figura 6A-B.** El tratamiento térmico de proteína de fibroína genera piruvato, indicando la modificación de la estructura primaria de la fibroína. (A) Gráfico resumen que muestra concentraciones de piruvato en soluciones de proteínas de fibroína de seda (50 mg/ml) no expuestas a calor o calentando a 65 °C (~150 °F), 90 °C (~200 °F) y 99 °C (~210 °F). (B) La duración del tratamiento térmico potencia adicionalmente la formación de piruvato a partir de fibroína de seda. Una exposición de 30 minutos de proteínas de seda acuosas a 99 °C (-210 °F) provoca casi la duplicación de los niveles de piruvato con respecto a los niveles de piruvato en el momento en que esta temperatura se consigue inicialmente y más que cuadruplica la de las muestras no calentadas.

**Figure 7A-B.** El tratamiento térmico altera la composición de aminoácidos de la proteína de seda nativa. (A) Gráfico resumen que muestra la composición de serina como un porcentaje del total de aminoácidos totales en la solución no calentada (es decir, 'no calentada' / técnica anterior) de proteína de seda (columna izquierda, 10 % de serina) y la solución de PDS sometida previamente al procesamiento como se describe en el Ejemplo 1 (por ejemplo, -121 °C, 117,21 kPa (17 psi)) durante 30 minutos ('calor'; columna derecha, 5,7 % de serina). El tratamiento de calor redujo la composición de serina en más del 40 % en las muestras de solución de PDS en comparación con las muestras de solución de fibroína de seda de la técnica anterior. (B) Gráfico resumen que representa los porcentajes de las concentraciones de glicina y alanina en una solución de proteína de fibroína de seda de la técnica anterior ('sin calor', columnas de la izquierda) y solución de PDS calentada y procesada a presión (-121 °C, 117,21 kPa (17 psi)) ('calor', columnas de la derecha). El procesamiento de calor y presión facilita un incremento en los niveles de glicina y alanina con respecto a los controles de solución de fibroína de seda de la técnica anterior.

**Figura 8.** Se situaron formulaciones diversas de muestras en una superficie encerada hidrófoba: solución salina tamponada con fosfato (PBS), TheraTears (TT), Blink, Systane Balance (SB) y formulación de PDS 5 % p/v (mostrada en la parte izquierda de la figura). Se fotografió la expansión de la solución de formulación y a continuación la superficie de expansión se midió en puntos temporales antes y después de la expansión mecánica (datos mostrados sobre el margen derecho de la figura). Después de la expansión mecánica, la formulación de PDS mostró una extensión potenciada significativamente (más del triple) en comparación a todas las otras formulaciones de muestra. **Figure 9A-C.** La transformación de aminoácidos en PDS perjudica las estructuras proteicas secundarias y permite la disolución. (A) Espectro de FTIR de muestras tanto preprocesadas como postprocesadas de muestras de agua templada de solución de FSTA y de solución de PDS. Las muestras de la técnica anterior muestran picos característicos importantes de lámina beta tras templar en agua de aproximadamente 1624 cm<sup>-1</sup> y 1510 cm<sup>-1</sup>, mientras que el espectro de la solución de PDS no indica la formación de picos de lámina beta y en cambio indica un contenido considerablemente reducido de contenido de láminas beta tras el procesamiento. (B) Imágenes representativas de soluciones de seda de PDS y de FSTA desecadas para formar películas. (C) La disolución subsecuente de películas de PDS en agua resultó completa, indicando que no se habían formado estructuras secundarias de lámina beta; sin embargo, las películas de FSTA no pudieron disolverse completamente, convirtiéndose en una mezcla de FSTA disueltas parcialmente y de agregados de proteínas que contienen láminas beta sin disolver.

**Figura 10.** La escisión enzimática de fibroína de seda con tripsina potencia la inestabilidad y acelera la formación de gel pero no afecta a la PDS. Gráfico resumen que representa la absorbancia (550 nm) de FSTA ultrasonificada tratada previamente con tripsina para los puntos temporales indicados. El aumento de absorbancia indica la formación de lámina beta de fibroína que culmina en la formación de gel, demostrando la inestabilidad de la solución.

**Figura 11.** Gráfico resumen que representa la absorbancia óptica longitudinal (550 nm) de soluciones de FSTA tratadas con ditiotreitól (DTT) 0 (control), 10 o 100 mM durante 30 minutos antes de la ultrasonificación. Los datos proporcionan un indicador de la formación de estructura secundaria en soluciones de FSTA o de PDS a lo largo

del tiempo. La acumulación de formación de láminas beta, mostrada como un incremento de absorbancia, sucede inmediatamente tras la sonicación de las soluciones de FSTA (por ejemplo, dentro de los 30 minutos y que se incrementa subsiguientemente). A la inversa, la PDS no muestra tendencia hacia la formación de estructuras secundarias. La reducción de puentes disulfuro con DTT retarda la formación de láminas beta y de gel subsiguiente, en comparación con el FSTA de control, pero el material forma en última instancia cantidades considerables de láminas beta. Por contra, la PDS no mostró tendencia a formar estructuras secundarias y permaneció estable. Por tanto, la reducción de puentes disulfuro en fibroína natural mejora la estabilidad pero no evita la formación de gel y la inestabilidad longitudinal de la FSTA se suprime en la PDS.

**Figura 12.** El calentamiento de FSTA en ausencia de bromuro de litio (LiBr) perjudica la gelificación. Gráfico resumen que representa la absorbancia óptica (550 nm) de soluciones de FSTA no calentadas (control) o calentadas a -93,33 °C (200 °F) durante las duraciones indicadas antes de la ultrasonicación. El calentamiento de la solución provocó un incremento en la absorbancia basal la cual se incrementó con la duración del calentamiento con respecto a la FSTA no calentada. Todas las soluciones de FSTA mostraron un incremento en la absorbancia a lo largo del tiempo, indicando un cambio de propiedades de las proteínas. Por contra, la PDS no mostró cambio de absorbancia después de la ultrasonicación a lo largo de la duración del experimento.

### Descripción detallada

La invención proporciona una composición proteica derivada de fibroína de seda. La composición proteica posee una solubilidad y una estabilidad potenciadas en soluciones acuosas. La secuencia de aminoácidos primarios de fibroína natural se modifica en la composición proteica derivada de fibroína de modo que se reducen o eliminan los puentes disulfuro de cisteína entre las cadenas de proteínas de fibroína pesada y de fibroína ligera. La composición tiene un contenido de serina que se reduce en más del 40 % en comparación con la proteína de fibroína natural y el peso molecular promedio en la composición es menor de aproximadamente 100 kDa.

### Definiciones

Se incluyen las siguientes definiciones para proporcionar una comprensión clara y coherente de la memoria descriptiva y de las reivindicaciones. Como se emplea en el presente documento, los términos enumerados tienen los siguientes significados. Todos los demás términos y expresiones utilizados en esta memoria descriptiva tienen sus significados habituales que entendería un experto en la materia. Tales significados habituales pueden obtenerse por referencia a diccionarios técnicos, tales como Hawley's Condensed Chemical Dictionary 14<sup>a</sup> edición, de R.J. Lewis, John Wiley & Sons, Nueva York, N.Y., 2001.

Las referencias en la memoria descriptiva a "una realización", "una realización", etc., indican que la realización descrita puede incluir un aspecto particular, rasgo, estructura, resto, o característica, pero no todas las realizaciones incluyen necesariamente ese aspecto, rasgo, estructura, resto, o característica. Por otro lado, tales expresiones pueden, pero no necesariamente, referirse a la misma realización a la que se hace referencia en otras partes de la memoria descriptiva. Además, cuando un aspecto particular, rasgo, estructura, resto, o característica se describe en relación con una realización, está dentro del conocimiento de un experto en la materia influir o conectar tal aspecto, rasgo, estructura, resto, o característico con otras realizaciones, se describa explícitamente o no.

Las formas singulares "un", "una", y "el/la" incluyen la referencia en plural a menos que el contexto estipule claramente otra cosa. Por tanto, por ejemplo, una referencia a "un componente" incluye una pluralidad de tales componentes, de manera que un compuesto X incluye una pluralidad de compuestos X. Se observa además que las reivindicaciones pueden redactarse para excluir cualquier elemento opcional. Como tal, esta declaración tiene la intención de servir como base antecedente para el uso de terminología exclusiva, tal como "solamente", "solo", "además de" y similares, en relación con cualquier elemento descritas en el presente documento y/o la enumeración de elementos de reivindicación o el uso de limitaciones "negativas".

El término "y/o" significa cualquiera de los elementos, cualquier combinación de los elementos o todos los elementos con los que está asociado este término. Las expresiones "uno o más" o "al menos uno" se entiende fácilmente por el experto en la materia, particularmente cuando se lee en el contexto de su uso. Por ejemplo, la expresión puede significar uno, dos, tres, cuatro, cinco, seis, diez, 100 o cualquier límite superior aproximadamente 10, 100 o 1000 veces superior que un límite inferior enumerado.

El término "aproximadamente" puede referirse a una variación de  $\pm 5\%$ ,  $\pm 10\%$ ,  $\pm 20\%$  o  $\pm 25\%$  del valor especificado. Por ejemplo, "aproximadamente 50" por ciento puede en algunas realizaciones suponer una variación de 45 a 55 por ciento. Para intervalos de enteros, el término "aproximadamente" puede incluir uno o dos enteros mayores y/o menores que un entero enumerado en cada extremo del intervalo. A menos que se indique lo contrario en el presente documento, el término "aproximadamente" pretende incluir valores, por ejemplo, porcentajes en peso, próximos al intervalo enumerado que son equivalentes en términos de funcionalidad del ingrediente individual, elemento, la composición, o la realización. El término aproximadamente puede modificar también los puntos finales de un intervalo enumerado como se debatió anteriormente en este párrafo.

Como entenderá el experto, todos los números, incluyendo los que expresan cantidades de ingredientes,

propiedades tales como peso molecular, condiciones de reacción y demás, son aproximaciones y se entiende que están modificados opcionalmente en todos los casos por el término "aproximadamente". Estos valores pueden variar dependiendo de las propiedades deseadas que buscan obtener los expertos en la materia utilizando las enseñanzas de las descripciones de este documento. También se entiende que tales valores contienen inherentemente una variabilidad resultante necesariamente de las desviaciones estándar encontradas en sus respectivas mediciones de ensayo.

Tal como entenderá el experto en la materia, para todos y cada uno de los fines, particularmente en términos de proporcionar una descripción escrita, todos los intervalos mencionados en este documento también abarcan todos y cada uno de los posibles subintervalos y combinaciones de subintervalos de los mismos, así como los valores individuales que componen el intervalo, particularmente los valores enteros. Un intervalo enumerado (por ejemplo, porcentajes en peso o grupos de carbonos) incluye cada valor específico, entero, decimal, o identidad dentro del intervalo. Cualquier intervalo enumerado puede reconocerse fácilmente como lo suficientemente descriptivo y permite que el mismo intervalo se divida en al menos mitades iguales, tercios, cuartos, quintos, o décimos. Como ejemplo no limitante, cada intervalo discutido en este documento puede dividirse fácilmente en un tercio inferior, tercio medio y tercio superior, etc. Como también comprenderá un experto en la materia, todas las expresiones tales como "hasta", "al menos", "mayor que", "menor que", "más que", "o más" y similares, incluyen el número enumerado y tales términos se refieren a intervalos que pueden desglosarse posteriormente en subintervalos como se discutió anteriormente. Del mismo modo, todas las proporciones que se mencionan en este documento también incluyen todas las subproporciones que se encuentran dentro de la proporción más amplia. Por consiguiente, los valores específicos enumerados para radicales, sustituyentes e intervalos, son solo para ilustración; no excluyen otros valores definidos u otros valores dentro de intervalos definidos para radicales y sustituyentes.

Un experto en la materia también reconocerá fácilmente que cuando los miembros se agrupan de manera común, tal como en un grupo de Markush, la divulgación abarca no solo a todo el grupo enumerado como un todo, sino cada miembro del grupo individualmente y todos los subgrupos posibles del grupo principal. Adicionalmente, para todos los fines, la invención abarca no solo al grupo principal, sino también al grupo principal ausente uno o más de los miembros del grupo. Por tanto, la invención contempla la exclusión explícita de uno o más de los miembros de un grupo enumerado. Por consiguiente, pueden aplicarse condiciones a cualquiera de las categorías o realizaciones divulgadas mediante las cuales uno o más de los elementos enumerados, especies, o realizaciones, pueden excluirse de tales categorías o realizaciones, por ejemplo, para su uso en una limitación negativa explícita.

El término "poner en contacto" se refiere al acto de tocar, haciendo contacto o acercándose a una proximidad inmediata o cercana, incluso a nivel celular o molecular, por ejemplo, para provocar una reacción fisiológica, una reacción química, o un cambio físico, por ejemplo, en una solución, en una mezcla de reacción, *in vitro* o *in vivo*.

Para una aplicación terapéutica, una "cantidad eficaz" se refiere a una cantidad eficaz para tratar una enfermedad, trastorno y/o afección o para provocar un efecto enumerado. Por ejemplo, una cantidad eficaz puede ser una cantidad eficaz para reducir la progresión o gravedad de la afección o los síntomas que se están tratando. La determinación de una cantidad terapéuticamente eficaz se encuentra dentro de las capacidades de los expertos en la materia. La expresión "cantidad eficaz" pretende incluir una cantidad de una composición descrita en este documento, o una cantidad de una combinación de compuestos descritos en el presente documento, por ejemplo, que es eficaz para tratar o prevenir una enfermedad o trastorno, o para tratar los síntomas de la enfermedad o trastorno, en un hospedador. Por tanto, una "cantidad eficaz" generalmente significa una cantidad que proporciona el efecto deseado.

Para procesar y preparar aplicaciones, una "cantidad eficaz" se refiere a una cantidad eficaz para lograr un efecto enumerado, tal como una cantidad necesaria para formar productos en una mezcla de reacción. La determinación de una cantidad eficaz se encuentra dentro de las capacidades de los expertos en la materia, especialmente a la luz de la divulgación detallada proporcionada en el presente documento. La expresión "cantidad eficaz" pretende incluir una cantidad de un compuesto o reactivo descrito en el presente documento o una cantidad de una combinación de compuestos descritos en el presente documento o condiciones referidas a un proceso descrito en el presente documento, por ejemplo, que es eficaz para formar los productos deseados en una mezcla de reacción. Por tanto, una "cantidad eficaz" generalmente significa una cantidad que proporciona el efecto deseado enumerado.

La fibroína se deriva de la crisálida del gusano de seda *Bombyx mori*. La proteína fibroína incluye una cadena pesada que es de aproximadamente 350-400 kDa en peso molecular y una cadena ligera que es de aproximadamente 25 kDa en peso molecular, en la que las cadenas pesada y ligera están juntas unidas mediante un enlace disulfuro. Se conocen en la técnica las secuencias primarias de las cadenas pesada y ligera. Las cadenas de proteína de fibroína poseen dominios C y N terminales hidrófilos y bloques alternantes de secuencias de aminoácidos hidrófobos/hidrófilos que permiten una mezcla de interacciones estéricas y electrostáticas con moléculas de alrededor en solución. Se sabe que en diluciones de baja concentración (1 % o menos) la molécula de proteína de fibroína asume una forma de cadena de proteína ampliada y no agregada inmediatamente en solución. La proteína de fibroína es altamente miscible con moléculas hidratantes tales como HA, PEG, glicerina y CMC, se ha visto que es altamente biocompatible y que integra o se degrada naturalmente dentro del cuerpo mediante acción enzimática. La fibroína natural o fibroína de seda de la técnica anterior (FSTA), se conoce en la técnica y se ha

descrito por, por ejemplo, Daithankar et al. (Indian J. Biotechnol. 2005, 4, 115-121).

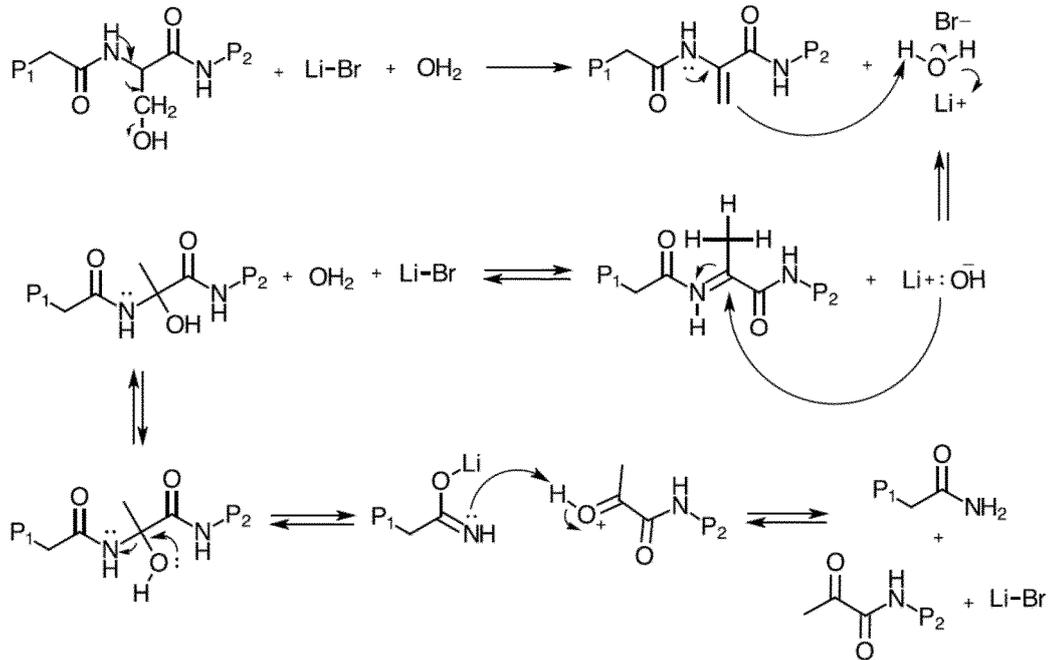
Las expresiones "proteína derivada de seda" (PDS) y "proteína derivada de fibroína" se utilizan de forma intercambiable en el presente documento. Estos materiales están preparados mediante los procesos descritos en el presente documento, implicando calor, presión y una concentración elevada de una solución de sal pesada. Por tanto, 'derivado de seda' y 'derivado de fibroína' se refiere al material de partida del proceso que modifica la proteína de fibroína de seda para llegar a una composición proteica con las propiedades estructurales, químicas y físicas descritas en el presente documento.

#### 10 Preparación de la composición proteica derivada de fibroína

La composición proteica derivada de fibroína descrita en el presente documento posee una estabilidad potenciada, en comparación con la fibroína natural en soluciones acuosas. La estabilidad potenciada alcanzada por la composición proteica derivada de fibroína, también referida en el presente documento como una proteína derivada de seda (SDP), permite al material permanecer en solución un tiempo considerablemente mayor que las proteínas de fibroína de seda naturales / de la técnica anterior (también referidas en el presente documento como FSTA). La estabilidad potenciada del material de PDS también permite la preparación de soluciones de PDS de concentración elevada sin agregación, precipitación o gelificación. En aplicaciones comerciales tales como con comida, bebida, gotas oftálmicas o aplicaciones que requieren proteína que sea soluble en solución, la estabilidad potenciada proporciona una vida útil prolongada adecuada y calidad del producto aumentada mediante la reducción de la agregación de proteínas. La agregación potencial de proteínas en solución afecta negativamente al rendimiento de un producto deseado para una aplicación particular. La capacidad de concentrar la PDS a constituciones elevadas en solución (más del 50 % p/v o > 500 mg/ml) es ventajosa considerablemente para inventariar una solución de trabajo útil que puede utilizarse tal cual o diluida para un sinnúmero de aplicaciones. Entre los ejemplos de tales aplicaciones se encuentran el uso de PDS como un ingrediente en alimentos, bebidas o formulaciones oftálmicas como un suplemento proteico o aditivo.

La estabilidad potenciada en soluciones acuosas se deriva de la transformación de secuencias de aminoácidos primarios de la proteína de fibroína natural en el material de PDS. Los cambios en la secuencia primaria disminuyen la susceptibilidad de las moléculas a agregarse. La agregación finalmente conduce a la formación de gel. En la transformación de la fibroína natural, los aminoácidos tanto de serina como de cisteína se escinden en presencia de calor elevado y condiciones deshidratantes. De forma similar, Patchornik et al. (J. Am. Chem. Soc. 1964, 86, 1206) demostraron que se forma un intermediario de deshidroalanina (DHA) a partir de serina y cisteína en solución. La degradación de aminoácidos se ve impulsada adicionalmente en presencia de un sistema de disolvente deshidratante fuerte, tal como la solución de LiBr al 50-55 % como se describe en el presente documento, en el que tiene lugar una migración de hidruro para inducir la eliminación de agua. La reacción de degradación puede tener lugar en presencia de iones hidróxido (por ejemplo, pH 7,5 a pH 11), que impulsa adicionalmente la escisión del intermediario de DHA. Esta escisión forma una amida, un péptido de piruvilo y LiBr. En el Esquema 1 se expone un mecanismo químico viable para un aminoácido de serina, cuyo esquema es aplicable también para aminoácidos de cisteína. La alteración química de los aminoácidos de serina y cisteína de la proteína de FSTA en un intermediario de DHA con escisión hidrolítica adicional, conduce a la estabilidad potenciada de la solución de los productos de PDS.

**Esquema 1.** Detalle esquemático de una reacción química fundamental para la degradación de serina y cisteína. La degradación se ve impulsada por la producción de un intermediario de DHA que se forma a partir de una reacción de migración de hidruro, en presencia de un medio de concentración elevada de sales que deshidrata. La degradación de DHA se consigue a través de una reacción de  $SN_2$  dentro del medio de disolvente básico.



La reacción de escisión debatida anteriormente afecta considerablemente a las propiedades macromoleculares de los péptidos resultantes, que resulta en una solución acuosa de material de PDS estabilizado. Se cree que el agregado de proteínas inicial de fibroína se inicia por interacciones de las cadenas pesada y ligera de fibroína natural en los aminoácidos de cisteína, como se describe en Greving et al. (Biomacromolecules 2012, 13(3): 676-682). Los aminoácidos de cisteína dentro de las cadenas ligera y pesada de fibroína interactúan entre sí a través de puentes disulfuro. Estos puentes disulfuro participan en la agregación de proteínas de fibroína y en la floculación en red del gel. Sin la presencia de la cadena ligera de fibroína natural, las proteínas son considerablemente menos susceptibles de agregación. Por tanto, el proceso descrito en el presente documento reduce eficazmente la capacidad de la cadena ligera de fibroína natural de formar puentes disulfuro mediante la reducción del contenido de cisteína y por tanto, eliminando o reduciendo la capacidad de formar puentes disulfuro. A través de este mecanismo, el proceso de transformación descrito en el presente documento funcionalmente estabiliza la PDS resultante en solución, mediante la reducción o eliminación de la capacidad para formar agregados derivados de cisteína.

Además de los puentes disulfuro que inducen la agregación, la susceptibilidad de la fibroína de seda para agregarse adicionalmente en una estructura floculada, se ve impulsada también por la química de los aminoácidos de la proteína, como se describe en Mayen et al. (Biophysical Chemistry 2015, 197:10-17). La modelización molecular de las secuencias de aminoácidos de serina de fibroína de seda, alanina y glicina, ha mostrado que la presencia de serina potencia la interacción proteína-proteína a través de una mayor propensión a crear puentes de hidrógeno entre fracciones de cadena de proteína de fibroína adyacentes. Los modelos demuestran que la serina reducida y el descenso de alanina y glicina, disminuyen la propensión inicial de agregación de proteínas. Las observaciones de la modelización molecular indican que al alterar la química de los aminoácidos naturales de la proteína de fibroína, podría generarse un material que tendría mayor estabilidad en la solución acuosa.

Una estrategia para conseguir la estabilidad potenciada es eliminar los grupos funcionales cargados, tales como hidroxilos, de la proteína. Debido a la elevada electronegatividad relativa de los grupos hidroxilo, la química puede impulsar tanto puentes de hidrógeno con átomos de hidrógeno disponibles como la interacción de cargas no específicas con grupos de aminoácidos cargados positivamente. Casi el 12 % del contenido de proteína de fibroína natural se compone de serina, que porta un grupo funcional de hidroxilo. Por tanto, al reducir la disponibilidad de grupos hidroxilo que facilitan puentes de hidrógeno, se puede potenciar la estabilidad global de la proteína en solución. El proceso descrito en el presente documento reduce eficazmente la cantidad del contenido de serina e incrementa el contenido relativo de alanina y glicina, lo cual elimina el número de grupos hidroxilo disponibles para crear puentes de hidrógeno. A través de este mecanismo, el proceso descrito en el presente documento estabiliza funcionalmente la PDS resultante en solución por periodos de tiempo prolongados (por ejemplo, al menos [6-8] meses y/o durante más de 1,5 años; están en marcha estudios extensos, que indican que la estabilidad podría mantenerse durante más de 2 años o más de 3 años).

Además de la reducción de fracciones de cisteína y serina, la interacción de cargas del disolvente es importante para estabilizar una solución de proteínas. Después de una floculación de proteínas inicial, se cree que el proceso de gelificación continúa para impulsar asociaciones más próximas entre las cadenas pesadas de fibroína natural, lo que conduce a la formación de láminas beta, tanto intra- como intermoleculares, entre bloques hidrófobos de las cadenas pesadas. Una vez sucede la formación considerable de láminas beta, la solución de fibroína cambia a un gel.

Mientras la solución cambia a un gel, la fibroína se vuelve insoluble y ya no es útil como un producto basado en solución. Para evitar la gelificación, el pH de la solución de PDS puede elevarse a alcalinidad elevada para potenciar la estabilidad, por ejemplo más de un pH de 7,5. Como resultado, el pH aumentado produce grupos hidroxilo libres adicionales que forman un escudo de valencia alrededor de las moléculas de PDS en solución. El escudo de valencia formado actúa para producir un potencial zeta que estabiliza la proteína reduciendo las interacciones proteína-proteína derivadas de puentes de hidrógeno o interacciones no específicas cargadas y/o hidrófobas. El proceso de transformación de fibroína estabiliza funcionalmente PDS formadas en solución a través de este y otros mecanismos.

10 El material de PDS se puede preparar mediante el proceso siguiente.

1. Se preparan crisálidas de seda quitando el material de las pupas y prelavando en agua tibia.
2. Las fibras de proteína de fibroína natural se extraen de las proteínas de sericina gomosas lavando las crisálidas en agua a temperatura elevada, típicamente a 95 °C o más, a un pH alcalino.
- 15 3. Las fibras de fibroína extraídas se secan y a continuación se disuelven utilizando un sistema de disolventes que neutraliza los puentes de hidrógeno entre las láminas beta; para esta etapa de neutralización es eficaz una solución acuosa de LiBr al 54 % de proteína de fibroína de seda 20 % p/v.
4. La proteína de fibroína disuelta en solución de LiBr se procesa en un medio de autoclave (~121 °C [~250 °F], a ~103,42 - 117,21 kPa (15-17 PSI) de presión, durante aproximadamente 30 minutos a temperatura).
- 20 5. La proteína de fibroína procesada por calor y la solución de LiBr a continuación se dializan para eliminar los iones de litio y bromuro de la solución. En este punto del proceso, el material se ha transformado químicamente en PDS.
6. La PDS dializada a continuación se filtra para eliminar cualquier agregado no disuelto y carga biológica contaminante.

25 La solución de PDS se produce utilizando un proceso diferente claramente respecto al proceso utilizado para la producción de solución de fibroína de seda actual, como se ilustra en la **Figura 1**. Especialmente, el autoclavado de la proteína de fibroína de seda si bien se combina con el LiBr en solución, inicia transiciones químicas para producir el material de PDS estabilizado. La proteína de fibroína se disuelve en solución de LiBr, lo cual neutraliza los puentes de hidrógeno y las interacciones electrostáticas de la proteína de fibroína natural solubilizada. Esto deja a la proteína sin confirmaciones de estructura secundaria específica en solución. Como resultado, la energía termodinámica necesaria para hidrolizar enlaces covalentes dentro de la cadena de proteína de fibroína se encuentra en sus requisitos de energía mínimos para iniciar la escisión hidrolítica.

35 La temperatura puede establecerse en condiciones de autoclave de 121 °C durante 30 minutos a 103,42 - 117,21 kPa (15-17 PSI). Sin embargo, las condiciones de procesamiento se pueden modificar para estabilizar el material de PDS en diversos grados. Se pueden utilizar agentes de solubilización de proteínas adicionales en el proceso, incluyendo sales de haluro adicionales tales como cloruro cálcico y tiocianato de sodio, agentes orgánicos como urea, hidrocloreuro de guanidina y 1,1,1,3,3,3-hexafluoroisopropanol, aditivos de solución líquida iónicos fuertes tales como nitrato de calcio y cloruro de 1-butil-3-metilimidazolio o una combinación de los mismos.

#### Composiciones proteicas derivadas de fibroína

45 La invención proporciona una composición proteica derivada de fibroína de seda, cuya composición posee solubilidad y estabilidad potenciadas en soluciones acuosas. En una realización, la invención proporciona una composición de proteína preparada mediante un proceso que comprende calentar una solución acuosa de fibroína a una presión elevada. La solución de fibroína acuosa incluye el bromuro de litio a una concentración de al menos 8M. La solución acuosa de fibroína se calienta a al menos aproximadamente 105 °C (221 °F) bajo una presión de al menos aproximadamente 68,95 kPa (10 PSI) durante al menos aproximadamente 20 minutos, para proporcionar la

50 composición proteica. Los polipéptidos de la composición proteica comprenden menos del 8,5 % de restos de aminoácidos de serina y la composición proteica tiene una viscosidad acuosa de menos de 5 mPa\*s (5 cP) como un 10 % p/p de solución en agua.

Se desvela una composición proteica preparada mediante un proceso que comprende calentar una solución de fibroína acuosa a una presión elevada, en la que la solución acuosa de fibroína comprende bromuro de litio a una concentración de 9-10M y en la que la solución acuosa de fibroína se calienta a una temperatura en el intervalo de aproximadamente 115 °C (239 °F) a aproximadamente 125 °C (257 °F), bajo una presión de aproximadamente 96,53 kPa (14 PSI) a aproximadamente 137,90 kPa (20 PSI) durante al menos aproximadamente 20 minutos; para proporcionar la composición proteica. La composición proteica incluye menos del 6,5 % de restos de aminoácidos de serina y la composición proteica tiene una viscosidad acuosa de menos de 10 mPa\*s (10 cP) como un 15 % p/p de solución en agua.

La invención proporciona también una composición proteica derivada de fibroína que posee una estabilidad potenciada en solución acuosa, en la que: las secuencias de aminoácidos primarios de la composición proteica derivada de fibroína difieren de la fibroína natural en al menos 4 % con respecto a la diferencia combinada en el contenido de serina, glicina y alanina (derivada de fibroína frente a FSTA); se reducen o eliminan los enlaces

disulfuro de cisteína entre las cadenas de proteínas de fibroína pesada y de fibroína ligera; la composición comprende aminoácidos de glicina superiores al 46,5 % y aminoácidos de alanina superiores al 30 %; y la composición tiene un contenido de serina que se reduce en más del 40 % en comparación con la proteína de fibroína natural, de modo que la composición comprende menos del 8 % de aminoácidos de serina. El peso molecular promedio de la composición de proteína derivada de fibroína es menor de aproximadamente 100 kDa y puede ser superior a aproximadamente 25 kDa.

Se desvela una composición proteica derivada de fibroína que posee una estabilidad potenciada en solución acuosa, en la que: las secuencias de aminoácidos primarios de la composición proteica derivada de fibroína difieren de la fibroína natural por lo menos por lo menos el 6 % con respecto a la diferencia combinada en el contenido de serina, glicina y alanina; se reducen o eliminan los enlaces disulfuro de cisteína entre las cadenas de proteínas de fibroína pesada y de fibroína ligera; y la composición tiene un contenido de serina que se reduce en más del 40 % en comparación con la proteína de fibroína natural. El peso molecular promedio de la composición de proteína derivada de fibroína es menor de aproximadamente 96 kDa y puede ser superior a aproximadamente 25 kDa.

Se desvela una composición proteica derivada de fibroína que posee una estabilidad potenciada en soluciones acuosas, en la que: las secuencias de aminoácidos primarios de la composición proteica derivada de fibroína están modificadas respecto a la fibroína de seda natural; se reducen o eliminan los enlaces disulfuro de cisteína entre las cadenas de proteínas de fibroína pesada y de fibroína ligera; el peso molecular promedio de la composición de proteína derivada de fibroína es menor de aproximadamente 100 kDa y puede ser superior a aproximadamente 25 kDa; y la composición proteica derivada de fibroína mantiene una absorbancia óptica a 550 nm de menos de 0,25 durante al menos dos horas después de cinco segundos de ultrasonificación. Por ejemplo, una solución de la composición proteica 5 % p/p puede mantener una absorbancia óptica de menos de 0,1 a 550 nm después de cinco segundos de ultrasonificación a 10 Hz y 20 % de amplitud, las cuales son condiciones estándar utilizadas para ultrasonificación descritas en el presente documento.

Se desvela una composición proteica derivada de fibroína que posee una estabilidad potenciada en soluciones acuosas, en la que: las secuencias de aminoácidos primarios de la composición proteica derivada de fibroína están modificadas respecto a la fibroína de seda natural de manera que difieren de la fibroína natural por lo menos por lo menos el 5 % con respecto a la diferencia combinada en el contenido de serina, glicina y alanina; se reducen o eliminan los enlaces disulfuro de cisteína entre las cadenas de proteínas de fibroína pesada y de fibroína ligera; el peso molecular promedio de la composición de proteína derivada de fibroína es menor de aproximadamente 96 kDa y puede ser superior a aproximadamente 25 kDa; y la composición proteica derivada de fibroína mantiene una absorbancia óptica a 550 nm de menos de 0,2 durante al menos dos horas después de cinco segundos de ultrasonificación.

Se puede aislar y/o purificar la composición proteica derivada de fibroína como un polvo seco o una película, por ejemplo, mediante diálisis y/o filtración. Como alternativa, se puede aislar y/o purificar la composición proteica derivada de fibroína como una solución acuosa estable, que puede modificarse para utilizar como una composición de alimentos o bebidas o como una formulación terapéutica, tal como una formulación oftálmica. Por tanto, la invención también proporciona una composición de alimentos o bebidas que incluye una composición proteica descrita en el presente documento y un componente de alimentos o bebidas. Los componentes alimentarios pueden incluir un azúcar simple o más, disacáridos, carbohidratos, grasas, aceites, vitaminas, minerales y agua. Los componentes de bebidas pueden incluir un azúcar simple o más, un agente colorante (por ejemplo, un colorante sintético o un colorante natural como el azafrán), vitaminas y minerales.

La composición de aminoácidos de la proteína derivada de fibroína puede diferir de la composición de aminoácidos de la fibroína natural en al menos el 4 %, en al menos un 4,5 %, en al menos un 5 % o en al menos un 5,5 % o en al menos un 6 %, con respecto al contenido de serina, glicina y alanina combinadas.

La composición puede tener un contenido de serina que se reduce en más del 45 %, en comparación con el contenido de serina de la proteína de fibroína natural.

El peso molecular promedio de la composición proteica derivada de fibroína puede ser menor de aproximadamente 100 kDa, menor de aproximadamente 98 kDa, menor de aproximadamente 96 kDa, menor de aproximadamente 95 kDa, menor de aproximadamente 90 kDa, menor de aproximadamente 85 kDa, menor de aproximadamente 80 kDa, menor de aproximadamente 75 kDa o menor de aproximadamente 70 kDa. El peso molecular promedio de la composición proteica derivada de fibroína puede ser mayor de aproximadamente 30 kDa, mayor de aproximadamente 35 kDa, mayor de aproximadamente 40 kDa, mayor de aproximadamente 50 kDa, mayor de aproximadamente 60 kDa o mayor de aproximadamente 70 kDa. Por consiguiente, el peso molecular promedio (peso promedio) de la composición proteica derivada de fibroína puede ser de aproximadamente 30 kDa a aproximadamente 100 kDa, aproximadamente 30 kDa a aproximadamente 96 kDa, aproximadamente 30 kDa a aproximadamente 90 kDa, aproximadamente 35 kDa a aproximadamente 80 kDa, aproximadamente 35 kDa a aproximadamente 70 kDa, aproximadamente 40 kDa a aproximadamente 60 kDa. El peso molecular promedio de la composición proteica derivada de fibroína es aproximadamente 60 kDa a aproximadamente 80 kDa, aproximadamente 50 kDa a aproximadamente 70 kDa, aproximadamente 40 kDa a aproximadamente 60 kDa,

aproximadamente 30 kDa a aproximadamente 50 kDa, aproximadamente 35 kDa a aproximadamente 45 kDa o aproximadamente 40 kDa a aproximadamente 43 kDa.

5 En diversas realizaciones, la composición proteica tiene una viscosidad acuosa de menos de 4 mPa\*s (4 cP) como una solución 10 % p/p en agua. En realizaciones adicionales, la composición proteica tiene una viscosidad acuosa de menos de 10 mPa\*s (10 cP) como una solución 24 % p/p en agua.

En algunas realizaciones, la composición proteica es soluble en agua al 40 % p/p sin ninguna precipitación observable mediante inspección ocular.

10 En diversas realizaciones, la composición proteica no gelifica con ultrasonificación de una solución acuosa de la composición proteica a concentraciones de hasta el 10 % p/p. Opcionalmente, la composición proteica no gelifica con ultrasonificación de una solución acuosa de la composición proteica a concentraciones de hasta el 15 % p/p, de hasta el 20 % p/p, de hasta el 25 % p/p, de hasta el 30 % p/p, de hasta el 35 % p/p o de hasta el 40 % p/p.

15 La composición proteica comprende menos del 8 % de restos de aminoácidos de serina. Opcionalmente, la composición proteica comprende menos del 7,5 % de restos de aminoácidos de serina, menos del 7 % de restos de aminoácidos de serina, menos del 6,5 % de restos de aminoácidos de serina o menos del 6 % de restos de aminoácidos de serina.

20 La composición proteica comprende más del 46,5 % de aminoácidos de glicina, con respecto al contenido de aminoácidos totales de la composición proteica. Opcionalmente, la composición proteica comprende más del 47 % de aminoácidos de glicina, más del 47,5 % de aminoácidos de glicina o más del 48 % de aminoácidos de glicina.

25 La composición proteica comprende más del 30 % de aminoácidos de alanina, con respecto al contenido de aminoácidos totales de la composición proteica. Opcionalmente, la composición proteica comprende más del 30,5 % de alanina, más del 31 % de alanina o más del 31,5 % de alanina.

30 En algunas realizaciones, la composición proteica se vuelve a disolver completamente después de secarse en una película fina. En diversas realizaciones, la composición proteica no tiene estructura de proteínas de lámina beta en solución acuosa. En ciertas realizaciones, la composición proteica mantiene una absorbancia óptica en solución acuosa de menos de 0,25 a 550 nm después de al menos cinco segundos de ultrasonificación.

35 En algunas realizaciones, la composición proteica está junto con agua. La composición proteica puede disolverse completamente en agua en una concentración de 10 % p/p o incluso en concentraciones mayores tales como 15 % p/p, 20 % p/p, 25 % p/p, 30 % p/p, 35 % p/p o 40 % p/p. En algunas realizaciones, la composición proteica se puede aislar y purificar, por ejemplo, mediante diálisis, filtrado o una combinación de las mismas.

40 Opcionalmente, la composición proteica potencia la expansión de una solución acuosa que comprende los componentes de la composición proteica y la formulación oftálmica, por ejemplo, en comparación con la expansión de una composición correspondiente que no incluye la composición proteica. La expansión potenciada puede dar como resultado un incremento del área de superficie de la solución acuosa mayor del doble o mayor del triple.

45 Opcionalmente, la composición proteica no forma un gel a concentraciones de hasta el 20 % p/p, de hasta el 30 % p/p o de hasta el 40 % p/p. La composición proteica puede permanecer en solución hasta una viscosidad de al menos 9,8 mPa\*s (9,8 cP).

50 Opcionalmente, la composición proteica derivada de fibroína puede tener segmentos de glicina-alanina-glicina-alanina (GAGA) de aminoácidos que comprenden al menos aproximadamente el 47,5 % de los aminoácidos de la composición proteica derivada de fibroína. La composición proteica derivada de fibroína puede tener también segmentos de glicina-alanina-glicina-alanina (GAGA) de aminoácidos que comprenden al menos aproximadamente el 48 %, al menos aproximadamente el 48,5 %, al menos aproximadamente un 49 %, al menos aproximadamente el 49,5 %, o al menos aproximadamente el 50 %, de los aminoácidos de la composición proteica.

55 Opcionalmente, la composición proteica derivada de fibroína puede tener segmentos de aminoácidos de glicina-alanina-glicina-alanina (GAGA) que comprenden al menos aproximadamente el 59 % de los aminoácidos de la composición proteica derivada de fibroína. La composición proteica derivada de fibroína puede tener también segmentos de glicina-alanina (GA) de aminoácidos que comprenden al menos aproximadamente el 59,5 %, al menos aproximadamente el 60 %, al menos aproximadamente el 60,5 %, al menos aproximadamente el 61 %, o al menos aproximadamente el 61,5 %, de los aminoácidos de la composición proteica.

65 En otra realización, las secuencias de aminoácidos primarios de la composición proteica derivada de fibroína difieren de la fibroína natural por lo menos por lo menos el 6 % con respecto a la diferencia combinada en el contenido de serina, glicina y alanina; el peso molecular promedio de la composición de proteína derivada de fibroína es menor de aproximadamente 100 kDa y puede ser superior de aproximadamente 30 kDa; y la composición proteica derivada de fibroína mantiene una absorbancia óptica a 550 nm de menos de 0,25 durante al menos dos horas después de cinco

segundos de ultrasonificación. Se desvela una composición proteica derivada de fibroína que posee una estabilidad potenciada en solución acuosa, en la que: las secuencias de aminoácidos primarios de la composición proteica derivada de fibroína difieren de la fibroína natural por lo menos por lo menos el 6 % con respecto a la diferencia combinada en el contenido de serina, glicina y alanina; se reducen o eliminan los enlaces disulfuro de cisteína entre las cadenas de proteínas de fibroína pesada y de fibroína ligera; la composición tiene un contenido de serina que se reduce en más del 40 % en comparación con la proteína de fibroína natural; y en la que el peso molecular promedio de la composición proteica derivada de fibroína es menor de aproximadamente 96 kDa.

Se desvela una composición proteica derivada de fibroína que posee una estabilidad potenciada en soluciones acuosas, en la que: las secuencias de aminoácidos primarios de la composición proteica derivada de fibroína están modificadas respecto a la fibroína de seda natural; se reducen o eliminan los enlaces disulfuro de cisteína entre las cadenas de proteínas de fibroína pesada y de fibroína ligera; el peso molecular promedio de la composición proteica derivada de fibroína es menor de aproximadamente 100 kDa; y la composición proteica derivada de fibroína mantiene una absorbancia óptica a 550 nm de menos de 0,25 durante al menos dos horas después de cinco segundos de ultrasonificación. Se desvela que las secuencias de aminoácidos primarios de la composición proteica derivada de fibroína están modificadas respecto a la fibroína de seda natural de manera que difieren de la fibroína natural por lo menos por lo menos el 5 % con respecto a la diferencia combinada en el contenido de serina, glicina y alanina; el peso molecular promedio de la composición proteica derivada de fibroína es menor de aproximadamente 96 kDa; y la composición proteica derivada de fibroína mantiene una absorbancia óptica a 550 nm de menos de 0,2 durante al menos dos horas después de cinco segundos de ultrasonificación.

Se desvela una composición proteica derivada de fibroína que posee una estabilidad potenciada en soluciones acuosas, en la que: las secuencias de aminoácidos primarios de la composición proteica derivada de fibroína están modificadas respecto a la fibroína de seda natural de manera que difieren de la fibroína natural por lo menos por lo menos el 5 % con respecto a la diferencia combinada en serina, contenido de glicina y alanina; se reducen o eliminan los enlaces disulfuro de cisteína entre las cadenas de proteínas de fibroína pesada y de fibroína ligera; el peso molecular promedio de la composición proteica derivada de fibroína es menor de aproximadamente 96 kDa; y la composición proteica derivada de fibroína mantiene una absorbancia óptica a 550 nm de menos de 0,2 durante al menos dos horas después de cinco segundos de ultrasonificación.

Se desvela una composición proteica preparada mediante un proceso que comprende calentar una solución de fibroína acuosa a una presión elevada, en la que la solución acuosa de fibroína comprende bromuro de litio a una concentración de al menos 8M y en la que la solución acuosa de fibroína se calienta a al menos aproximadamente 105 °C (221 °F) bajo una presión de al menos aproximadamente 68,95 kPa (10 PSI) durante al menos aproximadamente 20 minutos; para proporcionar la composición proteica, en la que la composición proteica comprende menos del 8,5 % de restos de aminoácidos de serina y la composición proteica tiene una viscosidad acuosa de menos de 5 mPa·s (5 cP) como una solución 10 % p/p en agua. Por tanto, la invención proporciona un método para preparar una composición proteica derivada de fibroína que comprende una o más de las etapas del proceso descrito en el presente documento.

Opcionalmente, la concentración de bromuro de litio es de aproximadamente 8.5M a aproximadamente 11M. Opcionalmente, la concentración de bromuro de litio es de aproximadamente 9M a aproximadamente 10M, o de aproximadamente 9.5M a aproximadamente 10M.

Opcionalmente, se calienta la solución acuosa de fibroína que contiene bromuro de litio a al menos aproximadamente 107 °C (225 °F), a aproximadamente 110 °C (230 °F), a aproximadamente 113 °C (235 °F), a aproximadamente 115 °C (239 °F) o a aproximadamente 120 °C (248 °F).

Opcionalmente, la solución acuosa de fibroína que contiene bromuro de litio se calienta a una presión de al menos aproximadamente 82,74 kPa (12 PSI), al menos aproximadamente 96,53 kPa (14 PSI), al menos aproximadamente 103,42 kPa (15 PSI) o al menos aproximadamente 110,32 kPa (16 PSI), hasta aproximadamente 124,11 kPa (18 PSI) o hasta aproximadamente 137,90 kPa (20 PSI).

Opcionalmente, la solución acuosa de fibroína que contiene bromuro de litio se calienta durante al menos aproximadamente 20 minutos, al menos aproximadamente 30 minutos, al menos aproximadamente 45 minutos o al menos aproximadamente 1 hora, hasta varias horas (por ejemplo, 12-24).

En algunas realizaciones, la composición proteica tiene una viscosidad acuosa de menos de 4 mPa·s (4 cP) como una solución 10 % p/p en agua. En diversas realizaciones, la composición proteica tiene una viscosidad acuosa de menos de 10 mPa·s (10 cP) como una solución 24 % p/p en agua.

En algunas realizaciones, la composición proteica se puede disolver en agua al 40 % p/p sin precipitación observable.

Opcionalmente, la fibroína se ha separado de la sericina.

Opcionalmente, el bromuro de litio se ha eliminado de la composición proteica para proporcionar una composición proteica purificada. Opcionalmente, la composición proteica se ha aislado y purificado, por ejemplo, mediante diálisis, filtrado o una combinación de las mismas.

- 5 En diversas realizaciones, la composición proteica no gelifica con la ultrasonificación de una solución acuosa de la composición a concentraciones de hasta el 10 % p/p, de hasta el 15 % p/p, de hasta el 20 % p/p, de hasta el 25 % p/p, de hasta el 30 % p/p, de hasta el 35 % p/p o de hasta el 40 % p/p.

- 10 Opcionalmente, la composición proteica tiene propiedades como se ha descrito anteriormente y composiciones de aminoácidos como se ha descrito anteriormente en cuanto al contenido en serina, glicina y alanina.

- 15 En diversas realizaciones, la composición proteica se vuelve a disolver después de secarse como una película fina. La composición proteica puede carecer de estructuras de proteínas de lámina beta en solución. La composición proteica puede mantener una absorbancia óptica en solución de menos de 0,25 a 550 nm después de al menos cinco segundos de ultrasonificación.

- 20 En una realización específica, la invención proporciona un proceso para preparar una composición proteica que comprende calentar una solución acuosa de fibroína a una presión elevada, en la que la solución acuosa de fibroína comprende bromuro de litio a una concentración de 9-10M y en la que la solución acuosa de fibroína se calienta a una temperatura en el intervalo de aproximadamente 115 °C (239 °F) a aproximadamente 125 °C (257 °F), bajo una presión de aproximadamente 999,74 kPa (145 PSI) a aproximadamente 137,90 kPa (20 PSI) durante al menos aproximadamente 20 minutos; para proporcionar la composición proteica, en la que la composición proteica comprende menos del 6,5 % de restos de aminoácidos de serina y la composición proteica tiene una viscosidad acuosa de menos de 10 mPa·s (10 cP) como una solución 15 % p/p en agua.

- 25 Se describen realizaciones adicionales de la invención más adelante en el presente documento.

- 30 La invención proporciona una nueva composición de proteína derivada de la seda (PDS) que es químicamente diferente de la proteína de fibroína de seda natural. La PDS tiene estabilidad potenciada en solución acuosa. La PDS puede utilizarse en un método para la formación de una composición alimentaria, una bebida o una formulación oftálmica que comprende la combinación de alimentos, bebidas o ingredientes oftálmicos con una composición proteica descrita en el presente documento, por ejemplo, una solución acuosa de composición proteica. La solución puede incluir PDS de aproximadamente 0,01 % a 92 % p/p de PDS. La solución puede ser de aproximadamente 8 % a 99,9 % p/p de agua.

- 35 En una realización, el material de PDS con estabilidad de la solución potenciada se puede utilizar como un ingrediente en una bebida para consumo humano o animal, tal como un ingrediente o un aditivo en una bebida deportiva, bebida suplementada, bebida de refresco o en agua embotellada. En otra realización, se puede utilizar el material de PDS con estabilidad de la solución potenciada como un ingrediente en un producto alimentario, tal como en productos lácteos, cereales o alimentos procesados. Todavía en otra realización, se puede utilizar el material de PDS con estabilidad de la solución potenciada como un ingrediente en una formulación para gotas oftálmicas, tales como en lágrimas artificiales, lubricantes oculares, exfoliante palpebral o en formulaciones terapéuticas.

- 45 En un aspecto, la invención proporciona un procedimiento que induce la hidrólisis, la degradación de aminoácidos o una combinación de los mismos, de la proteína de fibroína de modo que el peso molecular promedio de la proteína se reduce de aproximadamente 100-200 kDa para la fibroína de seda producida que utilizad los métodos de la técnica anterior a aproximadamente 30-90 kDa o aproximadamente 30-50 kDa, para el material de PDS descrito en el presente documento. Los polipéptidos resultantes pueden ser un surtido de péptidos de pesos moleculares diferentes que en promedio se ajustan a los intervalos enumerados en el presente documento. Además, la química de los aminoácidos se puede alterar reduciendo el contenido de cisteína a niveles no detectables mediante procedimientos de ensayo estándar. Por ejemplo, el contenido de serina se puede reducir en más del 50 % respecto a los niveles encontrados en la fibroína natural, la cual puede dar como resultado un incremento en el contenido global de alanina y glicina del 5 % (contenido de aminoácidos relativo), como se determinó mediante procedimientos de ensayo estándar. El proceso puede proporcionar una composición proteica en la que la proteína de cadena ligera de fibroína no es distinguible después del procesamiento, tal como cuando se desplaza la muestra utilizando los métodos de electroforesis estándar de SDS-PAGE. Adicionalmente, el material de PDS resultante forma una estructura de proteína secundaria de lámina beta mínima o inexistente tras el procesamiento, mientras que la solución de fibroína de seda producida utilizando métodos de la técnica anterior forma cantidades considerables de estructura secundaria de lámina beta. Opcionalmente, el material de PDS se puede preparar mediante el procesamiento de fibras de fibroína de seda en condiciones de autoclave o similares al autoclave (es decir, aproximadamente a 120 °C y 96,53 - 124,11 kPa (14-18 PSI)) en presencia de una solución de bromuro de litio 40-60 % p/p.

- 65 En algunas realizaciones, la invención proporciona un producto alimentario o bebida que incluye el PDS como un ingrediente. El PDS puede servir para proporcionar un contenido proteico adicional, que da como resultado la mejora del valor nutricional, beneficios para la salud y/o ventajas terapéuticas para el ser humano o animal que consuma la

comida o bebida. En una realización, el PDS se incluye en una bebida tal como agua, bebidas deportivas, bebida energética o bebida carbonatada. En otra realización, la SDP se incluye en productos alimentarios tales como el yogur, barritas energéticas, cereales, panes o pasta.

5 El producto alimentario o bebida puede incluir una cantidad eficaz de PDS, tal como aproximadamente el 0,01 % en peso a aproximadamente el 92 % en peso de PDS. Opcionalmente, la PDS puede estar presente en aproximadamente del 0,1 % en peso a aproximadamente el 30 % en peso, aproximadamente del 0,5 % en peso a aproximadamente el 20 % en peso o aproximadamente del 1 % en peso a aproximadamente el 10 % en peso. Opcionalmente, la PDS se puede obtener de fibroína del gusano de seda *Bombyx mori*.

10 Opcionalmente, la invención proporciona una composición oftálmica para el tratamiento del síndrome de ojo seco en un humano o un mamífero. La composición puede ser una solución acuosa que incluye una cantidad eficaz de PDS para tratar el síndrome de ojo seco. Por ejemplo, la solución acuosa puede incluir aproximadamente del 0,01 % en peso a aproximadamente el 80 % en peso de PDS. Opcionalmente, la solución acuosa puede incluir PDS a aproximadamente el 0,1 % en peso a aproximadamente el 10 % en peso o a aproximadamente el 0,5 % en peso a aproximadamente el 2 % en peso. Opcionalmente, la composición oftálmica puede incluir aproximadamente el 0,05 % p/v de PDS, aproximadamente el 0,1 % p/v de PDS, aproximadamente el 0,2 % p/v de PDS, aproximadamente el 0,25 % p/v de PDS, aproximadamente el 0,5 % p/v de PDS, aproximadamente el 0,75 % p/v de PDS, aproximadamente el 1 % p/v de PDS, aproximadamente el 1,5 % p/v de PDS, aproximadamente el 2 % p/v de PDS, aproximadamente el 2,5 % p/v de PDS, aproximadamente el 5 % p/v de PDS, aproximadamente el 8 % p/v de PDS o aproximadamente el 10 % p/v de PDS. La PDS se puede obtener de fibroína del gusano de seda *Bombyx mori*.

25 Opcionalmente, la formulación oftálmica puede incluir componentes adicionales en la solución acuosa, tal como un agente demulcente, un agente tamponador y/o un agente estabilizante. El agente demulcente puede ser, por ejemplo, ácido hialurónico (AH), hidroxietilcelulosa, hidroxipropilmetilcelulosa, dextrano, gelatina, un poliol, carboximetil celulosa (CMC), polietilenglicol, propilenglicol (PG), hipromelosa, glicerina, polisorbato 80, alcohol polivinílico o povidona. El agente demulcente puede estar presente, por ejemplo, a aproximadamente el 0,01 % en peso a aproximadamente el 10 % en peso o a aproximadamente el 0,2 % en peso a aproximadamente el 2 % en peso. Opcionalmente, el agente demulcente es AH. En diversas realizaciones, el AH puede estar presente a aproximadamente el 0,2 % en peso de la formulación.

30 El agente tamponador o estabilizante de una formulación oftálmica puede ser solución salina tamponada con fosfato, solución salina tamponada con borato, solución salina tamponada de citrato, cloruro de sodio, cloruro de calcio, cloruro de magnesio, cloruro de potasio, bicarbonato de sodio, cloruro de zinc, ácido clorhídrico, hidróxido de sodio, disodio de edetato o una combinación de las mismas.

35 Una formulación oftálmica puede incluir adicionalmente una cantidad eficaz de un conservante antimicrobiano. El conservante antimicrobiano puede ser, por ejemplo, perborato de sodio, policuanterium-1 (por ejemplo, conservante de Polyquad®), cloruro de benzalconio (BAK), clorito de sodio, brimonidina, brimonidina pura, plexitonium o una combinación de las mismas.

40 Una formulación oftálmica puede incluir también una cantidad eficaz de un vasoconstrictor, un antihistamínico o una combinación de los mismos. El vasoconstrictor o el antihistamínico puede ser hidrocloreuro de nafazolina, hidrocloreuro de efedrina, hidrocloreuro de fenilefrina, clorhidrato de tetrahidrozolina, maleato de feniramina una combinación de las mismas.

45 Opcionalmente, una formulación oftálmica puede incluir una cantidad eficaz de proteína derivada de fibroína, como se describe en el presente documento, junto con agua o uno o más componentes oftálmicos. Los componentes oftálmicos pueden ser, por ejemplo, a) alcohol polivinílico; b) PEG-400 y ácido hialurónico; c) PEG-400 y propilenglicol, d) CMC y glicerina; e) propilenglicol y glicerina; f) glicerina, hipromelosa y PEG-400; o una combinación de uno cualquiera o más de los componentes precedentes. La formulación oftálmica puede incluir uno o más ingredientes inactivos tales como HP-guar, borato, cloruro de calcio, cloruro de magnesio, cloruro de potasio, cloruro de zinc y similares. La formulación oftálmica puede incluir también un conservante oftálmico o más, tal como el clorito de sodio (conservante Purite® (NaClO<sub>2</sub>), poliquad, BAK, EDTA, ácido sórbico, alcohol bencílico y similares. Se pueden incluir componentes oftálmicos, ingredientes inactivos y conservantes a aproximadamente del 0,1 % a aproximadamente el 5 % p/v, tal como aproximadamente el 0,25 %, el 0,3 %, el 0,4 %, el 0,5 %, el 1 %, el 2 %, el 2,5 % o el 5 % o un intervalo entre cualquiera de los valores anteriormente mencionados.

50 Por consiguiente, la invención proporciona una composición proteica derivada proteína de seda (PDS) que posee una estabilidad potenciada en soluciones acuosas en las que la secuencia de aminoácidos primaria de fibroína natural se modifica a fibroína de seda natural, en la que se reducen o eliminan los puentes de disulfuro de cisteína entre las cadenas de proteínas de fibroína ligera y de fibroína pesada; en la que la composición tiene un contenido de serina que se reduce en más del 40 % en comparación con la proteína de fibroína natural; y en la que el peso molecular promedio de la proteína derivada de seda es menor de aproximadamente 100 kDa.

65

Se desvela una formulación oftálmica para el tratamiento de trastornos oftálmicos en un ser humano o un mamífero, en el que la formulación oftálmica comprende agua y una cantidad eficaz de la PDS como se ha descrito anteriormente. Se desvela una composición oftálmica para utilizar como un tratamiento ocular en un ser humano o un mamífero, en el que la composición oftálmica comprende agua, uno o más de un agente tamponador y de agente estabilizante y una cantidad eficaz de la PDS como se ha descrito anteriormente.

La PDS es altamente estable en agua, en la que la estabilidad de vida útil de la solución es más del doble que la de la fibroína de seda natural en solución. Por ejemplo, la PDS es altamente estable en agua, en la que la estabilidad de vida útil de la solución es más de 10 veces superior en comparación con la de la fibroína de seda natural en solución. El material de PDS, cuando está en solución acuosa, no gelifica con la sonicación de la solución a una concentración del 5 % (50 mg/ml). En otras realizaciones, el material de PDS, cuando está en solución acuosa, no gelifica con la sonicación de la solución a una concentración del 10 % (100 mg/ml).

El material de PDS puede tener la cadena ligera de fibroína eliminada en más del 50 % en comparación con la proteína de fibroína de seda natural. El material de PDS puede tener un contenido de aminoácidos de serina de menos de aproximadamente el 8 % de contenido relativo de aminoácidos o un contenido de aminoácidos de serina de menos de aproximadamente el 6 % de contenido relativo de aminoácidos.

El material de PDS tiene un contenido de aminoácidos de glicina por encima de aproximadamente el 46,5 %. El material de PDS tiene un contenido de aminoácidos de alanina por encima de aproximadamente el 30 % o puede tener un contenido de aminoácidos de alanina por encima aproximadamente del 30,5 %. El material de PDS puede tener contenido del aminoácido cisteína no detectable, por ejemplo, como determinó el análisis por HPLC del polipéptido hidrolizado de la composición proteica.

El material de PDS puede formar el 90 % menos, el 95 % menos o el 98 % menos de estructuras secundarias de proteína de láminas beta, en comparación con la proteína de fibroína de seda natural, por ejemplo, como se determinó mediante el análisis de FTIR descrito en el Ejemplo 8, más adelante.

Se proporciona una composición oftálmica para utilizar como un tratamiento ocular en un ser humano o un mamífero, la composición que comprende una solución acuosa que incluye una cantidad eficaz de material de PDS como se ha descrito anteriormente y un agente tamponador o estabilizante.

Se proporciona una formulación oftálmica para el tratamiento de trastornos oftálmicos en seres humanos o mamíferos, la composición que comprende una solución acuosa que incluye una cantidad eficaz de material de PDS con estabilidad potenciada como se describe en el presente documento.

Se proporciona un método para formar una mezcla para beber, una composición alimentaria o una composición oftálmica, con proteína de seda que comprende la combinación de alimentos, bebidas o componente oftálmicos con la composición proteica derivada de fibroína descrita en el presente documento.

Los siguientes Ejemplos pretenden ilustrar la invención anterior y no debe interpretarse como una reducción de su alcance. Un experto en la materia reconocerá fácilmente que los ejemplos sugieren muchas otras formas en las que se podría practicar la invención. Debe entenderse que pueden realizarse numerosas variaciones y modificaciones mientras permanecen dentro del alcance de la invención.

#### **Ejemplo 1. Preparación de proteínas derivadas de seda y la prueba de estabilidad de Lawrence**

**Materiales.** Las crisálidas de gusano de seda se obtuvieron de Tajima Shoji Co., Ltd., Japón. El bromuro de litio (LiBr) se obtuvo de FMC Lithium, Inc., Carolina del Norte. Se obtuvo un autoclave de Tuttnauer Ltd., Nueva York. Las membranas de diálisis de valor de corte de 3.500 Da de peso molecular (MWCO; del inglés, molecular-weight cutoff) se obtuvieron de ThermoScientific, Inc., Massachusetts. Un electrodo de ion selectivo de doble junta de bromuro (Br) se consiguió de ISE, Oakton Instruments, Illinois.

**Procesamiento.** Se prepararon dos muestras, PDS y fibroína de seda de la técnica anterior, como se ilustra en la **Figura 1**. En resumen, la PDS se produjo sumergiendo crisálidas de gusano de seda sin pupas, cortadas (3-5 cortes/crisálida) en agua desionizada calentada a 95 °C (dH<sub>2</sub>O) que contiene 0,3 % p de NaCO<sub>3</sub> a 233 ml de agua/gramo de crisálidas. Se agitaron las crisálidas en esta solución durante 75 minutos para disolver la sericina, separándola así de las fibras de seda. Las crisálidas se lavaron subsiguientemente cuatro veces en diluciones similares de dH<sub>2</sub>O durante 20 minutos por aclarado para eliminar la sericina residual de las fibras de seda lavadas. A continuación, las fibras se secaron en un horno de convección a 60 °C durante 2 horas, se pesaron y se disolvieron en 54 % p en agua en una relación de 4x volumen de LiBr por gramo de fibra extraída. Se cubrió esta solución y a continuación se calentó en un horno de convección a 60 °C durante 2 horas para acelerar la disolución de la fibra extraída. La solución se colocó a continuación en un autoclave y se expuso a condiciones de esterilización (121 °C, 117,21 kPa (17 PSI), 90-100 % humedad) durante 30 minutos para facilitar la transformación de fibroína. La solución resultante se dejó enfriar a temperatura ambiente, a continuación se diluyó al 5 % de fibroína con dH<sub>2</sub>O y se dializó para eliminar sales de LiBr utilizando una membrana de MWCO de 3.500 Da. Se realizaron múltiples intercambios

en dH<sub>2</sub>O hasta que los iones de Br fueron menos de 1-ppm, como se determinó en la lectura de la solución de fibroína hidrolizada en un electrodo de ion selectivo de doble junta de bromuro (Br) de Oakton. A continuación, la solución se filtró adicionalmente utilizando un filtro de porosidad de 1-5 µm, seguido de filtración a través de un filtro de pulido de 0,2 µm. Se hace referencia a este producto como una 'solución de PDS' en la **Figura 2**.

Se preparó una solución de fibroína de seda 'control' como se ilustra en la **Figura 1** para proporcionar la 'solución de fibroína de seda de la técnica anterior' mostrada en la **Figura 2**. Excepto la etapa de autoclave, se realizó el mismo proceso como se ha descrito anteriormente. Se situó un volumen de muestra (5 ml) de cada muestra en vasos de precipitados de 20 ml separados y los vasos de precipitados se sellaron con papel de aluminio. A continuación, las muestras se sometieron a la prueba de estabilidad de Lawrence.

La prueba de estabilidad de Lawrence se realiza situando la solución de muestra de proteína acuosa (5 % p/v, 50 mg/ml) dentro de la cámara del autoclave. A continuación, se activa el autoclave durante un ciclo a 121 °C, 117,21 kPa (17 PSI), durante 30 minutos, a 97-100 % de humedad. Después de completar el ciclo, se deja a la solución enfriar y a continuación se retira de la cámara del autoclave. A continuación, se agita la solución para observar el comportamiento gelificante de la solución. Si la solución ha gelificado con la agitación durante ~10 segundos, la muestra no pasa la prueba de estabilidad de Lawrence. Que no pasa la prueba indica que el material es inestable inherentemente como una solución de proteínas.

Se realizó una prueba de estabilidad de Lawrence tanto sobre la solución de PDS como la solución de fibroína de seda de la técnica anterior. La muestra de la solución de fibroína de seda de la técnica anterior gelificó inmediatamente y por tanto, no pasa la prueba de estabilidad de Lawrence. A la inversa, la muestra de solución de PDS permaneció en solución indefinidamente y por tanto pasó la prueba de estabilidad de Lawrence. La falta de gelificación puede atribuirse al hecho de que la producción de solución de PDS incorporó la etapa de procesamiento por autoclave, como se indicó en la **Figura 1** con anterioridad. En la **Figura 2** se muestran los diferentes resultados de prueba (no gelificada frente a gelificada).

### **Ejemplo 2. Caracterización de peso molecular de proteínas derivadas de seda**

Para evaluar el efecto del procesamiento sobre la distribución de peso molecular de proteína solubilizada, se sometieron a la solución de PDS y a la solución de fibroína de seda de la técnica anterior a electroforesis en gel de poliacrilamida (PAGE), que separa proteínas por peso molecular. Concretamente, se mezclaron 15 µg de cada muestra con tampón de ejecución que contiene dodecil sulfato sódico y ditiotreitol (Biorad Inc., California) para eliminar cualquier estructura de plegamiento secundario y puentes de disulfuro, respectivamente. Las mezclas se calentaron a 70 °C durante 5 minutos. Las mezclas se cargaron junto con una escala de peso molecular de 2,5-200 kDa (Life Technologies, California) en geles prefabricados de gradiente de poliacrilamida 4-12 % conteniendo sales tamponadoras Bis-Tris (Life Technologies, California) y a continuación, se expusieron a un campo eléctrico de 120V durante 90 minutos en un suministro de BioRad PowerPac Power (BioRad Inc., California). A continuación, se retiraron los geles y se colocaron en la tinción de Coomassie Blue durante 12 horas para teñir proteínas, seguido de 6 horas de lavado con dH<sub>2</sub>O. A continuación, se escanearon los geles en un densitómetro calibrado GS-800 de BioRad (BioRad Inc., California).

El gel resultante se muestra en la **Figura 3**. Los resultados muestran que el procesamiento empleado para preparar la solución de PDS cambia considerablemente el peso molecular promedio de 150-200 kDa a menos de 80 kDa (**Figura 3**). El cambio en peso molecular indica claramente una transformación de la estructura primaria y/o secundaria de la fibroína natural original. Además, la cadena ligera de fibroína no se encuentra presente en la PDS después del proceso de autoclavado (visible en 23-26 kDa en el Carril 2 para la fibroína de la técnica anterior), lo cual indica que la porción de cadena ligera de fibroína de la proteína se ha degradado o eliminado mediante el procesamiento. Estos resultados demuestran que el proceso de autoclave transforma la proteína de fibroína natural en un nuevo material que tiene fragmentos peptídicos más pequeños que la proteína de fibroína natural. El proceso degrada/modifica adicionalmente la cadena ligera de fibroína. Estas transformaciones dan como resultado un material de PDS que posee estabilidad de la solución potenciada como resultado de estos cambios químicos.

### **Ejemplo 3. Estudio de estabilidad de proteínas derivadas de seda**

Para determinar adicionalmente el impacto funcional del proceso de autoclave sobre la estabilidad de la PDS resultante en comparación con la estabilidad de la fibroína de la técnica anterior, las muestras se analizaron utilizando los métodos de Wang et al. (Biomaterials 2008, 29(8):1054-1064) para imitar un modelo bien caracterizado de gelificación de proteína de fibroína de seda. Se añadieron volúmenes de ambas muestras (0,5 ml, PDS y FSTA) a tubos de centrifugación transparentes de 1,7 ml y se sometieron a ultrasonificación (amplitud del 20 %, 10 Hz, 15 segundos). Los tubos transparentes que contenían las soluciones, a continuación se monitorizaron visualmente para observar la formación de gel, como una pantalla para gelificación.

Las muestras de solución de PDS no formaron geles, como se muestra en la **Figura 4A**. Incluso 3 meses después de la sonicación, las muestras de PDS permanecieron en solución y no mostraron agregación de proteínas, como se determinó mediante inspección visual. La muestra de solución de fibroína de seda de la técnica anterior gelificó

rápida (en el plazo de 2 horas) después de la sonicación. El gel resultante de fibroína de seda la técnica anterior se muestra en la **Figura 4B**. Estos resultados indican adicionalmente que el proceso de autoclave transforma la fibroína de la técnica anterior en un nuevo material e induce estabilidad al material de PDS resultante.

#### 5 Ejemplo 4. Impacto del calentamiento sobre el perfil de viscosidad de soluciones de seda acuosa

Se investigaron las propiedades fisicoquímicas de FSTA y PDS, prestando atención particular en el impacto de la concentración de proteína sobre la viscosidad de la solución. Se ha mostrado por Zafar et al. (Biomacromolecules 2015, 16(2):606-614) que las proteínas de cadena pesada y ligera de fibroína de seda son distintas en sus propiedades reológicas y por tanto, las tasas de degradación diferencial de estos constituyentes en la FSTA pueden imbuir cambios impredecibles a la viscosidad de una solución dada a lo largo del tiempo. Adicionalmente, el impacto de la concentración total de fibroína sobre la viscosidad no es lineal, mostrado también por Zafar et al. y escala rápidamente así como las soluciones de fibroína purificadas exceden los 100 mg/ml, restringiendo así la concentración utilizable de la solución de proteína durante una aplicación en particular.

Para determinar si estas limitaciones podrían superarse a través de transformaciones de aminoácidos que culminan en PDS, se generaron 80-100 ml de FSTA o de PDS tratada en autoclave a 50-80 mg/ml. Para evaluar el impacto del calentamiento de FSTA a un nivel por debajo de las condiciones de autoclavado, la FSTA se calentó a 107,22 °C (225 °F) durante 30 minutos en un recipiente de reacción encamisado como se ha descrito anteriormente. Las soluciones purificadas se colocaron en bandejas de pesado de plástico poco profundas de 140 mm en una campana de flujo laminar (Baker Sterilgard 56400, Class II) a ~22 °C para facilitar la evaporación. En intervalos periódicos, se recogieron las muestras de concentración para medir el contenido de proteínas (calculado en % p/p) y se evaluó la viscosidad utilizando un viscosímetro (Brookfield LVDV-E, spindle 00). Las mediciones se hicieron a revoluciones de eje por minuto (aproximadamente 1-100 rpm) que permitieron un intervalo de torsión que permitiría mediciones de viscosidad exactas, medido a 25 °C, en volúmenes de muestra de 16 ml.

Como se resume en la **Figura 5**, la viscosidad de FSTA se elevó precipitadamente cuando las soluciones excedieron los 75 mg/g. Adicionalmente, la FSTA no se pudo concentrar a >200 mg/g, punto al cual la proteína de fibroína comenzó a convertirse en insoluble. Las soluciones de FSTA se calentaron a 107,22 °C (225 °F) antes de la diálisis, demostraron el impacto del calor sobre la viscosidad de la solución. En particular, la FSTA exhibió viscosidades disminuidas en cualquier concentración dada respecto a la FSTA no calentada. Por contra, la PDS exhibió cambios mínimos en la viscosidad de la solución a concentraciones iguales o inferiores a 140 mg/g (**Figura 5**). Adicionalmente, la viscosidad de PDS permaneció por debajo de ~10 mPa·s (~10cP) a concentraciones de proteínas en las que la FSTA no pudo continuar en solución (por ejemplo, a 240 mg/g). Es importante destacar que, la PDS pudo permanecer homogénea a concentraciones que excedían los 400 mg/g, en las que las viscosidades permanecieron por debajo de 150 mPa·s (150 cP).

Una solución acuosa de PDS por tanto exhibe menor viscosidad cuando se compara con FSTA para todas las concentraciones por encima del 4 % p/p. Adicionalmente, la gelificación comienza a suceder a aproximadamente el 20 % p/p para la solución de FSTA, punto en el cual las medidas exactas de viscosidad no fueron posibles, si bien el material de PDS incrementó en concentración sin exhibir gelificación, composiciones de agregación o incrementos considerables en la viscosidad a través de soluciones del 25 % p/p.

Tomados conjuntamente, estos resultados demuestran claramente que las transformaciones de proteínas relacionadas con procesos descritos en el presente documento para la preparación de PDS, son necesarios para la producción de una solución de proteínas altamente concentrada, de baja viscosidad.

#### Ejemplo 5. Formación de péptidos de piruvoil

La reacción química ilustrada en el **Esquema 1** descrita anteriormente da como resultado la producción de un péptido de piruvoil. El péptido de piruvoil se degrada en piruvato, el cual resulta fácilmente detectable mediante un ensayo de piruvato estándar. Para demostrar que la aplicación de calor y presión (por ejemplo, el medio en un autoclave) podría facilitar la generación de piruvoil en el procesamiento de proteína de fibroína de seda, se produjo solución de fibroína de seda acuosa (5 % p/v en agua), utilizando el método de la técnica anterior descrito anteriormente. A continuación, se calentó el material en un vaso de precipitados encamisado térmicamente (ChemGlass, Nueva Jersey) a temperaturas definidas hasta los 98,89 °C (210 °F) o justo por debajo del punto de ebullición de la solución de proteínas. Concretamente, las soluciones de proteínas de fibroína de seda de la técnica anterior se calentaron a ~65 °C (~150 °F), ~90 °C (~200 °F) o ~99 °C (~210 °F) y a continuación, se tomaron muestras tras alcanzar estas temperaturas para medir las concentraciones de piruvato por medio de un ensayo colorimétrico (Pyruvate Assay Kit, MAK071, Sigma-Aldrich).

La producción de piruvato se incrementó en ambas muestras calentadas a 90 °C y 99 °C. El piruvato se incrementó en un 50 % a 99 °C (**Figura 6A**). Para determinar si la conversión de piruvato se potenció adicionalmente a lo largo del tiempo, las muestras se calentaron a 99 °C y se mantuvo a esta temperatura durante 30 minutos (**Figura 6B**). El calor mantenido causó un incremento robusto en la formación de piruvato, generando un incremento de más del cuádruple en piruvato respecto a las muestras no calentadas. Estos resultados indican que con el calentamiento de

la proteína de fibroína de seda, hay una conversión química a piruvoil que contiene material como se detectó mediante el ensayo de piruvato. A partir de estos datos se puede concluir que dentro de un ambiente de calentamiento más extremo, tal como en un proceso de autoclave, la proteína de fibroína de seda será estimulada para producir piruvato en una extensión incluso mayor. Esto proporciona una evidencia adicional de que el producto de PDS final es una entidad distinta químicamente de la fibroína de seda de la técnica anterior.

#### Ejemplo 6. Análisis del perfil de aminoácidos

El impacto del calentamiento de fibras de fibroína de seda disueltas en solución de LiBr 9.3M sobre un perfil de aminoácidos se investigó utilizando un cromatógrafo de intercambio iónico (AOAC Official Method 994.12, Amino Acids.com, Minnesota). Se produjeron muestras utilizando los procesos descritos en el Ejemplo 1 tanto para la solución de PDS como para la solución de fibroína de seda de la técnica anterior. A continuación, las soluciones se presentaron en concentraciones tipo para la evaluación mediante cromatografía. Se prestó atención particular a los aminoácidos serina, glicina y alanina, dada su constitución destacada en la secuencia primaria de proteínas de fibroína de seda y sus papeles clave en la formación de estructura secundaria.

Se encontró que las muestras de solución de PDS contenían un 40 % menos de serina respecto a las muestras de solución de fibroína de seda de la técnica anterior (**Figura 7A**) y un incremento correspondiente en los niveles de glicina y alanina (**Figura 7B**). Estos resultados indican un cambio considerable en el contenido de aminoácidos, cuyo cambio da como resultado propiedades químicas y físicas diferentes (y potenciadas), como resultado del proceso de autoclave. Estos resultados también corroboran los hallazgos en la bibliografía de Mayen et al. (Biophysical Chemistry 2015. 197:10-17) en los que se mostró el contenido de serina para incrementar la agregación inicial de proteínas de fibroína de seda, mientras que la proteína de fibroína de seda con contenido de glicina y alanina que incrementa, requirió umbrales de energía mayores para agregarse inicialmente. Por tanto, reduciendo la serina e incrementando el contenido tanto de alanina como de glicina, se reduce o elimina la propensión (y/o posibilidad) a la agregación, conduciendo a la mayor estabilidad de la solución de la PDS.

#### Ejemplo 7. Formulaciones de lágrima artificial

La solución de PDS se utilizó para formular una lágrima artificial para utilizar en el tratamiento de afecciones y trastornos oftálmicos. Las lágrimas artificiales pueden formularse específicamente y utilizarse para el tratamiento de trastorno 'ojo seco'. Las lágrimas artificiales pueden formularse y utilizarse también para el tratamiento de una lesión ocular creada por un ataque accidental o quirúrgico.

La incorporación de PDS en formulaciones de lágrima artificial resulta especialmente ventajosa, debido a que incrementa la extensibilidad de la formulación. Las lágrimas artificiales que contienen PDS también tienen una vida útil extremadamente larga debido a su estabilidad en solución. La disposición de copolímeros de bloque de grupos de aminoácidos hidrófilos e hidrófobos situados en el esqueleto central de la proteína PDS permite a las moléculas interactuar con químicos solubles en agua e insolubles en agua dentro de la película de lágrima. Cuando se incluyen como un ingrediente en una formulación de gotas oftálmicas de lágrima artificial, el ingrediente de PDS actúa para potenciar la extensibilidad de la lágrima artificial, lo cual proporciona una comodidad adicional al paciente y una eficacia prolongada al producto. Los grupos de agregación de la solución de fibroína de seda de la técnica anterior no son necesarios para esta propiedad de extensibilidad, por lo que resulta ventajoso eliminar estas regiones para potenciar la estabilidad del producto de proteínas en solución a lo largo del tiempo.

La capacidad de extensión potenciada de la lágrima artificial se demostró comparando productos de lágrima artificial de primeras marcas con una lágrima artificial formulada utilizando el ingrediente de PDS. Se utilizó un protocolo de prueba para evaluar el efecto de la extensión mecánica sobre la capacidad de humectación de diversos productos de gotas oftálmicas. Se compararon en el experimento solución salina tamponada con fosfato (PBS), lágrimas artificiales de TheraTears® (TT) de AVR, gotas oftálmicas Blink® Tears de AMO, gotas oftálmicas de Systane Balance® (SB) de Alcon y una formulación que contiene PDS. Como referencia, el PBS contenía sales de PBS 100 mmol en agua, el TT contiene carboximetil celulosa (CMC) 0,25 % p como el ingrediente activo con sales tamponadoras adicionales en agua, Blink contiene ácido hialurónico (AH) 0,2 % p como el ingrediente activo con sales tamponadoras en agua, el SB contiene polietilenglicol (PG) 0,6 % p como el ingrediente activo con Hp-guar y aceite mineral como excipientes potenciadores con sales tamponadoras y la solución de PDS contenía CMC 0,25 % p con un 1 % p/v. La PDS y las sales tamponadoras (es decir, tampón fosfato 0.01M que contiene NaCl 137 mM).

Este grupo de productos comparados incluyeron múltiples demulcentes y excipientes potenciadores de ingredientes activos adicionales. La Figura 8 muestra que la inclusión del ingrediente de PDS potencia la capacidad de expansión mecánica en cerca de cuatro veces las formulaciones de primeras marcas. Esta potenciación tras la extensión se puede comparar con la limpieza del párpado a lo largo de la superficie ocular. Por tanto, el ingrediente de PDS permite mayor comodidad al paciente mientras se potencia la eficacia y estabilidad del producto. Adicionalmente, la adición de PDS sobre la solución de fibroína de seda de la técnica anterior como un ingrediente resulta ventajosa debido a que la solución de fibroína de seda de la técnica anterior gelificaría y se agregaría durante la vida útil del producto. Estos agregados serían inaceptables en una formulación oftálmica basada en los requerimientos actuales de la farmacopea de Estados Unidos de América (UPS; del inglés, United States Pharmacopeia) (Materia particulada

en inyecciones: USP< 788-789>).

### Ejemplo 8. Análisis de la estructura secundaria de proteínas

5 Se evaluó el impacto del procesamiento de autoclave en la formación de estructura secundaria. Una solución de PDS 5 % p/v y una solución de fibroína de seda de la técnica anterior 5 % p/v (100 µl de cada), se vertieron sobre superficies de goma de silicona de 14 mm de diámetro (n=6) y se las dejó secar al aire en películas sólidas a lo largo de varias horas. A continuación, se evaluaron las películas mediante FTIR ATR (Nicolet iS10, Thermo Scientific, Massachusetts) a una resolución de 4 nm de 16 exploraciones.

10 Las películas se procesaron también durante 5 horas dentro de una cámara de temple de agua, la cual es un contenedor de vacío con la cubeta llena de agua para crear un medio de HR 100 %. El vapor de agua induce la formación de estructuras secundarias de las películas de proteínas de fibroína, más especialmente, estructuras de lámina beta como mostraron Jin et al. (Advanced Functional Materials 2005, 15:1241-1247). A continuación, las muestras de película se analizaron con el FTIR como se ha descrito anteriormente. El análisis espectral reveló que las películas de fibroína de PDS y de seda de la técnica anterior produjeron firma de IR similares antes del procesamiento del material, pero el material de PDS careció de la capacidad para formar estructuras secundarias de lámina beta después del procesamiento, como denota la ausencia de los picos de absorción bien conocidos de lámina beta en las regiones Amida I y II del espectro de IR a 1624 cm<sup>-1</sup> y 1510 cm<sup>-1</sup>, respectivamente (**Figura 9A**). Este hallazgo representa una diferencia considerable en la composición material de las dos muestras, lo cual es una indicación directa de que la química de aminoácidos es diferente inherentemente en las muestras de PDS y FSTA.

25 Para representar el impacto de la estructura secundaria funcionalmente, se secaron 150 ml de ambas muestras de las soluciones en un medio convectivo con aire limpio a temperatura ambiente durante 48 horas. Esto dio como resultado la formación de material proteico sólido que demostró las diferencias considerables en la apariencia entre las dos soluciones (**Figura 9B**). Más especialmente, el material de PDS procesado en autoclave mostró una translucidez amarillo oscuro que indica cambios químicos en los aminoácidos aromáticos, en comparación con el material de FSTA transparente y más pelucido. Además, el material de PDS formó una película seca que evitó que la región inferior del volumen se deshidratara completamente y por tanto, permaneció parcialmente líquido. Este no fue el caso del material de fibroína de seda de la técnica anterior, que se secó completamente y se deformó físicamente en un material ondulado. Estos resultados indican cambios considerables de las propiedades mecánicas del material y por tanto, de las interacciones químicas, como resultado del procesamiento de autoclave para formar el material de PDS.

35 Para evaluar la solubilidad como una función del procesamiento de autoclave, se pesaron y reconstituyeron muestras de ambos materiales secos en agua desionizada (dH<sub>2</sub>O). Para el material de PDS la película dura más externa se desprendió y se pesó, a la par que una porción de la fibroína de seda de la técnica anterior del material se retiró y se pesó. En ambas muestras, se añadieron 500 mg de material a 25 ml de dH<sub>2</sub>O (solución 2 % p/v) y se sometieron a agitación vorticial alta velocidad durante 10 minutos. Cabe destacar que, el material de PDS se disolvió completamente en el volumen de dH<sub>2</sub>O, si bien el material de fibroína de seda de la técnica anterior se disolvió solo mínimamente (**Figura 9C**). Estos resultados indican que la solubilidad del material y la química de la solubilidad cambió claramente entre los materiales de PDS y de fibroína de seda de la técnica anterior, debido al procesamiento de autoclave.

### 45 Ejemplo 9. Impacto de la escisión de fibroína enzimática sobre la estabilidad de la solución

Para identificar si la estabilidad incrementada de la PDS es una consecuencia directa de la transformación de aminoácidos o se debe meramente a la producción de proteínas de fibroína más pequeñas generadas por hidrólisis, se trató fibroína de seda de la técnica anterior (FSTA) con serina proteasa tripsina para romper enzimáticamente la fibroína, como se ha realizado por Shaw (Biochem. J. 1964, 93(1), 45-54). En resumen, se añadieron 0,5-1,0 mg/ml de tripsina aislada de páncreas bovino (Sigma-Aldrich, T1426, Misuri) a una solución de FSTA (78 mg/ml) que contiene sales de tampón de HEPES, se mezcló y se incubó a 37 °C durante 1, 2, 4 o 6 horas. Las reacciones se detuvieron con la adición de fluoruro de fenilmetilsulfonilo (PMSF; del inglés, phenylmethylsulfonyl fluoride) 2 mM y se midió el fraccionamiento de la extensión de fibroína mediante PAGE-1D y densitometría, como se describe en el Ejemplo 3.

**Tabla 1.** Peso molecular promedio de la fibroína de seda de la técnica anterior escindida enzimáticamente con tripsina a lo largo de duraciones crecientes.

Tratamiento	Peso molecular promedio (kDa)
FSTA (control)	107
tripsina 1 hora	93
tripsina 2 horas	79
tripsina 4 horas	70
tripsina 6 horas	70

Tal como se muestra en la Tabla 1, el tratamiento de tripsina se probó eficaz para reducir progresivamente el peso molecular promedio de la FSTA hasta las 4 horas. A continuación se sometieron estos materiales a ultrasonificación para iniciar la formación de láminas beta y la gelificación tal como se realizó y describió por Wang et al. (Biomaterials 2008, 29(8):1054-1064). El fraccionamiento de FSTA con tripsina provocó una aceleración drástica en las cinéticas de gelificación, sin embargo, lo que se resume en la **Figura 10**. Concretamente, el tratamiento de FSTA con 1 hora de tripsina indujo a la formación de gel durante ~40 minutos seguido de sonicación, la cual se demoró a ~60 minutos en la FSTA expuesta a tripsina durante 4 horas. El control de FSTA (en presencia de tripsina desactivada) mostró inestabilidad creciente con el tiempo, alcanzado la máxima formación de láminas beta (indicada por la absorbancia a 550 nm, **Figura 10**) en aproximadamente 1300 minutos (datos no mostrados). Por contra, las proteínas derivadas de seda (PDS) no mostraron tendencia hacia la inestabilidad durante este marco temporal, demostrado por una absorbancia mínima e invariable a 550 nm (**Figura 10**). Estos resultados indican que el fraccionamiento de FSTA mediante escisión enzimática de enlaces peptídicos seleccionados, sin transformación de aminoácidos, son ineficaces y de hecho, contraproducentes para prevenir la formación de láminas beta, la inestabilidad y la formación de gel.

**Ejemplo 10. Impacto de los enlaces disulfuro en la estabilidad de la fibroína**

La asociación entre los dímeros de cadena pesada y de cadena ligera de fibroína existe a través de un enlace disulfuro covalente sencillo, como se aclaró por Tanaka et al. (Biochim Biophys Acta. 1999, 1432(1):92-103). La separación de dímeros puede provocar las interacciones péptido-péptido de fibroína, que culmina en la agregación de proteínas insolubles (Shulha et al., Polymer 2006, 47:5821-5830) que precede a la formación de láminas beta y a la gelificación (Nagarkar et al., Phys. Chem. Chem. Phys. 2010, 12: 3834-3844). Por tanto, para determinar si la alteración del dímero de cadena pesada-ligera de fibroína estimula la agregación de proteínas y por tanto la inestabilidad, la FSTA se trató con el agente reductor de enlace disulfuro ditioneitol (DTT, Sigma-Aldrich, Misuri) a 0 (control), 10 o 100 mM y a continuación, se sometió a ultrasonificación para provocar la formación de láminas beta y de gel. Como se muestra en la **Figura 11**, la reducción del enlace disulfuro en FSTA con DTT 10 mM se desaceleró, pero no se inhibió la inestabilidad, indicado por la absorbancia a 550 nm a lo largo del tiempo con respecto a las muestras de control. Estos efectos fueron adicionalmente pronunciados con DTT 100 mM, aunque todavía ineficaces para prevenir la inestabilidad. Por contra, la PDS no mostró tendencia hacia la inestabilidad después de la ultrasonificación, indicado por una absorbancia inicial sin cambios, que no se vio afectada por la adición de DTT (**Figura 11**). En conjunto, estos resultados demuestran que el puente disulfuro de fibroína participa en los mecanismos subyacentes de la inestabilidad de la FSTA, pero su reducción es ineficaz para impedir la formación de láminas beta y la gelificación.

**Ejemplo 11. La estabilidad de fibroína requiere calor en presencia de bromuro de litio**

Para determinar si la transformación mediada por calor de aminoácidos en FSTA requiere bromuro de litio, se emprendieron estudios para identificar si se podría alcanzar una estabilidad similar cuando el FSTA se calentó en la solución acuosa final (que carece de bromuro de litio). Con este fin, se preparó la FSTA (sin calentamiento adicional) a una concentración de 50 mg/ml y a continuación, se calentó en un vaso de precipitados encamisado (Chemglass, CG-1103-01, Nueva Jersey) conectado con un calentador/enfriador (Neslab, RTE-7, ThermoScientific, Massachusetts) que distribuye activamente fluido de intercambio de calor de aceite de silicona (AceGlass, 14115-05, Nueva Jersey). El circulador se estableció en ~ 93,33 °C (200 °F), la temperatura justo por debajo del punto de ebullición de la FSTA que carece de sales de bromuro de litio y se permitió que estabilizara durante 15 ± 1 minutos. Se incubó la FSTA (25 ml) en el vaso de precipitados con una varilla de agitación revestida con PTFE y se colocó en una placa de agitación (IKA C-MAG HS7, Carolina del Norte) para garantizar la homogeneidad de la temperatura de la solución. La temperatura de la FSTA se monitorizó activamente a lo largo del periodo de calentamiento utilizando un termopar externo (Omega HH-603, Omega Engineering, Connecticut) y se extrajeron muestras (3 ml) en los siguientes puntos temporales:

Temperatura	Punto de tiempo
20 °C (68 °F)	0 min
91,11 °C (196 ± 1 °F)	30 min
91,11 °C (196 ± 1 °F)	60 min
91,11 °C (196 ± 1 °F)	90 min
91,11 °C (196 ± 1 °F)	120 min

Las muestras extraídas se sometieron, a continuación, a ultrasonificación para provocar la formación de láminas beta y la gelificación, como se ha descrito anteriormente por Wang et al. (Biomaterials 2008, 29(8):1054-1064). Para comparar estos resultados con la FSTA que se ha calentado en presencia de bromuro de litio, la PDS se ultrasonificó también por separado y se monitorizó la absorbancia a 550 nm longitudinalmente para comparar las cinéticas de la inestabilidad de la fibroína. Como se muestra en la **Figura 12**, la aplicación de calor al FSTA, en realidad, incrementa la absorbancia inicial y por lo tanto, la inestabilidad con respecto a las muestras de control no calentadas. Adicionalmente, la duración de la exposición a calor (de 30 a 120 minutos) para la FSTA fue inversamente

- proporcional a la absorbancia basal, indicando que la presencia de bromuro de litio durante la producción de PDS es necesaria para alcanzar la absorbancia mínima observada en esta última solución (**Figura 12**). Adicionalmente, la absorbancia a 550 nm continuó aumentando en todas las soluciones de FSTA calentadas a lo largo del tiempo, pero no varió de la inicial en soluciones de PDS ultrasonificadas, demostrando claramente, por tanto, que las muestras tratadas con calor experimentaron la formación de láminas beta y se volvieron por lo tanto inestables. En conjunto, estos resultados indican que la hidrólisis mediada por calor de la FSTA en ausencia de bromuro de litio es insuficiente para mediar en las transformaciones que facilitan la estabilidad de proteínas en el mismo grado que para la PDS descritas en el presente documento.
- 5
- 10 Aunque las realizaciones específicas se han descrito anteriormente a propósito de las realizaciones y ejemplos desvelados, tales realizaciones son solo ilustrativas y no limitan el alcance de la invención. Pueden hacerse cambios y modificaciones según la habilidad ordinaria en la técnica sin apartarse de la invención en sus aspectos más amplios, como se define en las siguientes reivindicaciones.
- 15 No deben entenderse de ellos limitaciones incoherentes con esta divulgación. La invención se ha descrito por referencia a diversas realizaciones y técnicas específicas y preferentes.

## REIVINDICACIONES

1. Una composición proteica derivada de fibroína que posee una estabilidad potenciada en solución acuosa, en la que:
- 5 las secuencias de aminoácidos primarios de la composición proteica derivada de fibroína difieren de la fibroína natural en al menos el 4 % con respecto al contenido combinado de aminoácidos de serina, glicina y alanina; se reducen o eliminan los enlaces disulfuro de cisteína entre las cadenas de proteína de fibroína pesada y de fibroína ligera;
- 10 la composición comprende aminoácidos de glicina superiores al 46,5 % y aminoácidos de alanina superiores al 30 %; la composición tiene un contenido de serina que se reduce en más del 40 % en comparación con la proteína de fibroína natural, de modo que la composición comprende menos del 8 % de aminoácidos de serina; y en el que el peso molecular promedio de la composición proteica derivada de fibroína es menor de
- 15 aproximadamente 100 kDa.
2. La composición proteica de la reivindicación 1 en la que la composición proteica tiene una viscosidad acuosa de menos de 4 mPa•s (4 cP) como un 10 % p/p de solución en agua.
- 20 3. La composición proteica de la reivindicación 1 en la que la composición proteica tiene una viscosidad acuosa de menos de 10 mPa•s (10 cP) como un 24 % p/p de solución en agua.
4. La composición proteica de la reivindicación 1 en la que la composición proteica es soluble en agua al 40 % p/p sin precipitación.
- 25 5. La composición proteica de la reivindicación 1 en la que la composición proteica no gelifica con ultrasonificación de una solución acuosa de la composición proteica a concentraciones de hasta el 10 % p/p.
6. La composición proteica de cualquiera de las reivindicaciones 1-5 en las que la composición proteica comprende menos del 6 % de restos de aminoácidos de serina.
- 30 7. La composición proteica de cualquiera de las reivindicaciones 1-5 en las que la composición proteica comprende más del 48 % de aminoácidos de glicina.
8. La composición proteica de cualquiera de las reivindicaciones 1-5 en las que la composición proteica comprende más del 31,5 % de aminoácidos de alanina.
- 35 9. La composición proteica de cualquiera de las reivindicaciones 1-5 en las que la composición proteica se vuelve a disolver completamente en agua después de haberse secado en una película fina; o en las que la composición proteica carece de estructura de proteínas de lámina beta en solución acuosa; o en las que la composición proteica mantiene una absorbancia óptica en solución acuosa de menos de 0,25 a 550 nm después de al menos cinco segundos de ultrasonificación.
- 40 10. La composición proteica de cualquiera de las reivindicaciones 1-5 en combinación con agua, en las que la composición proteica se disuelve completamente en el agua en una concentración de 40 % p/p.
- 45 11. La composición proteica derivada de fibroína de cualquiera de las reivindicaciones 1-5 en las que las secuencias de aminoácidos primarios de la composición proteica derivada de fibroína difieren de la fibroína natural en por lo menos el 6 % con respecto a la diferencia combinada en el contenido de serina, glicina y alanina; el peso molecular promedio de la de proteína derivada de fibroína es menor de aproximadamente 100 kDa y superior a aproximadamente 30 kDa; y la composición proteica derivada de fibroína mantiene una absorbancia óptica a 550 nm de menos de 0,25 durante al menos dos horas después de cinco segundos de ultrasonificación.
- 50 12. La composición proteica de cualquiera de las reivindicaciones 1-11 obtenible mediante un proceso que comprende:
- 55 calentar una solución de fibroína acuosa a una presión elevada, en el que la solución acuosa de fibroína comprende bromuro de litio a una concentración de al menos 8M y en el que la solución acuosa de fibroína se calienta a al menos aproximadamente 105 °C (221 °F) bajo una presión de al menos aproximadamente 68,95 kPa (10 PSI) durante al menos aproximadamente 20 minutos; para proporcionar la composición proteica, en el que la composición proteica comprende menos del 8,5 % de restos de aminoácidos de serina y la composición proteica tiene una viscosidad acuosa de menos de 5 mPa•s (5 cP) como una solución 10 % p/p en agua; y
- 60 en el que la composición proteica comprende cadenas de péptidos que terminan en grupos amida (-C(=O)NH<sub>2</sub>).
- 65

13. Un proceso para preparar una composición de cualquiera de las reivindicaciones 1 a -11, el proceso que comprende  
calentar una solución de fibroína acuosa a una presión elevada,  
5 en el que la solución acuosa de fibroína comprende bromuro de litio a una concentración de al menos 8M y  
en el que la solución acuosa de fibroína se calienta a al menos aproximadamente 105 °C (221 °F) bajo una presión  
de al menos aproximadamente 68,95 kPa (10 PSI) durante al menos aproximadamente 20 minutos;  
para proporcionar la composición proteica, en el que la composición proteica comprende menos del 8,5 % de restos  
de aminoácidos de serina y la composición proteica tiene una viscosidad acuosa de menos de 5 mPa•s (5 cP) como  
10 una solución 10 % p/p en agua.
14. El proceso de la reivindicación 13, en el que la composición proteica comprende cadenas de péptidos que  
terminan en grupos amida (-C(=O)NH<sub>2</sub>).
15. Una composición de alimentos o bebidas o una formulación de gotas oftálmicas que comprende la composición  
15 proteica de la reivindicación 1 o la composición proteica preparada mediante el proceso de la reivindicación 13 y un  
componente de alimentos o bebidas o un componente de formulación de gotas oftálmicas.

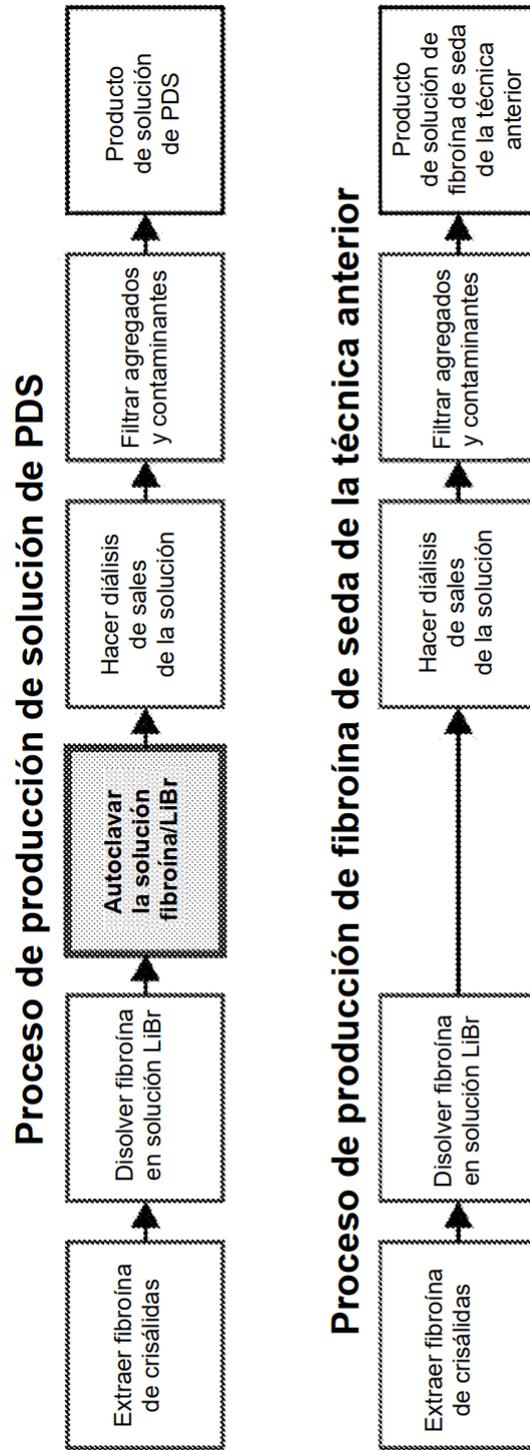
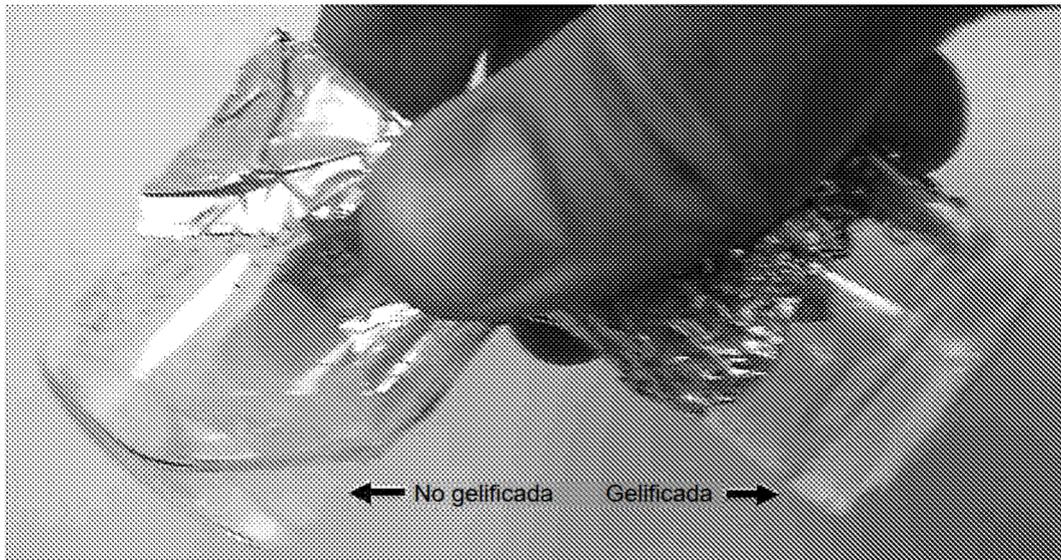


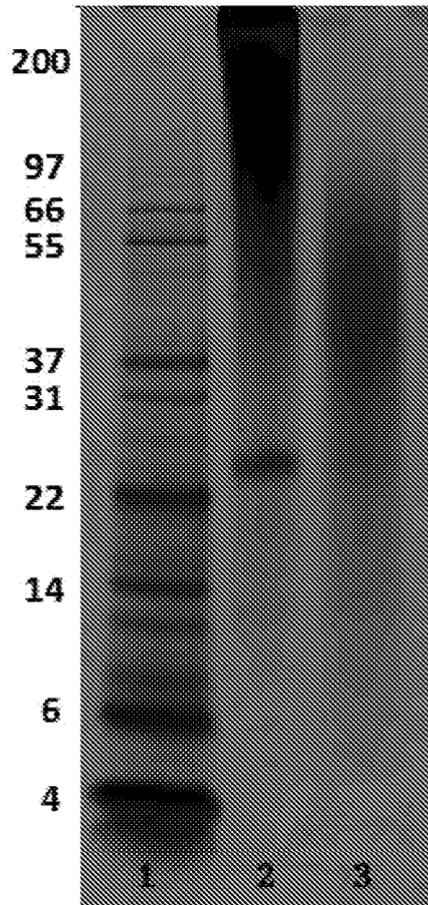
Fig. 1



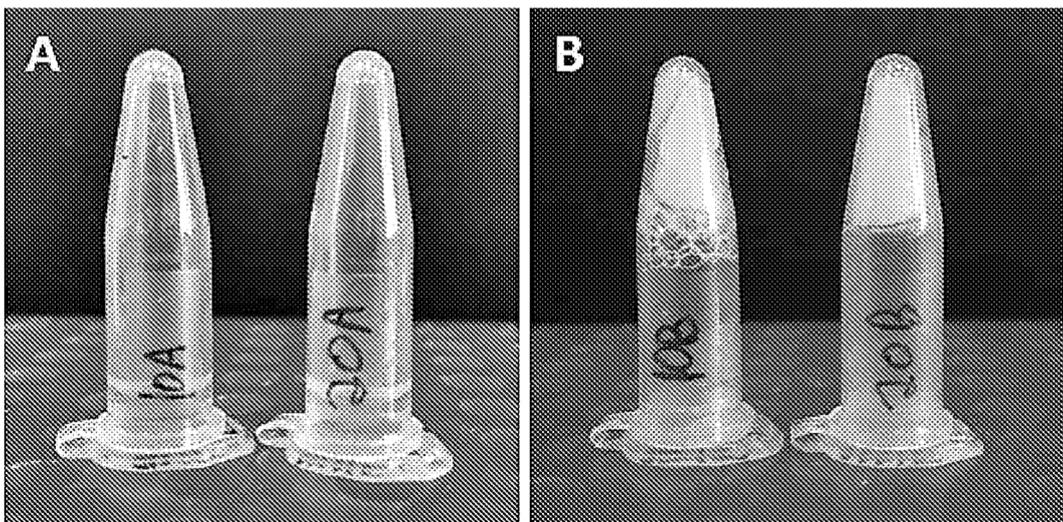
**Muestra 1**  
**(no gelificada)**  
**Solución de PDS**

**Muestra 2**  
**(completamente gelificada)**  
**Solución de fibroína**  
**de seda de la técnica anterior**

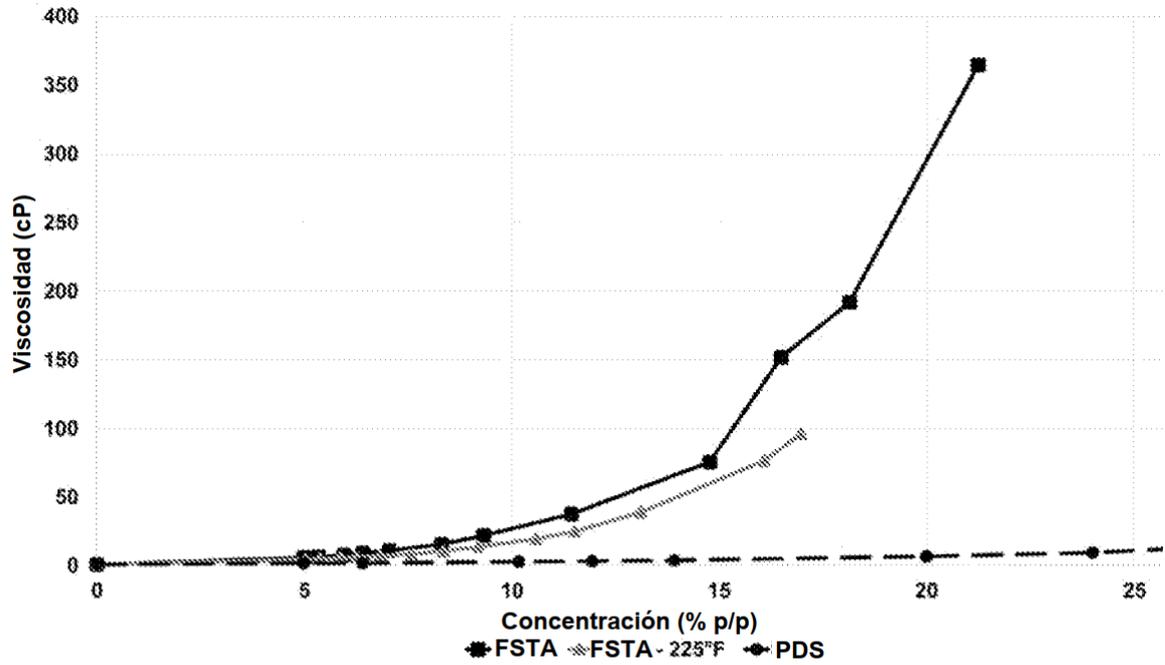
***Fig. 2***



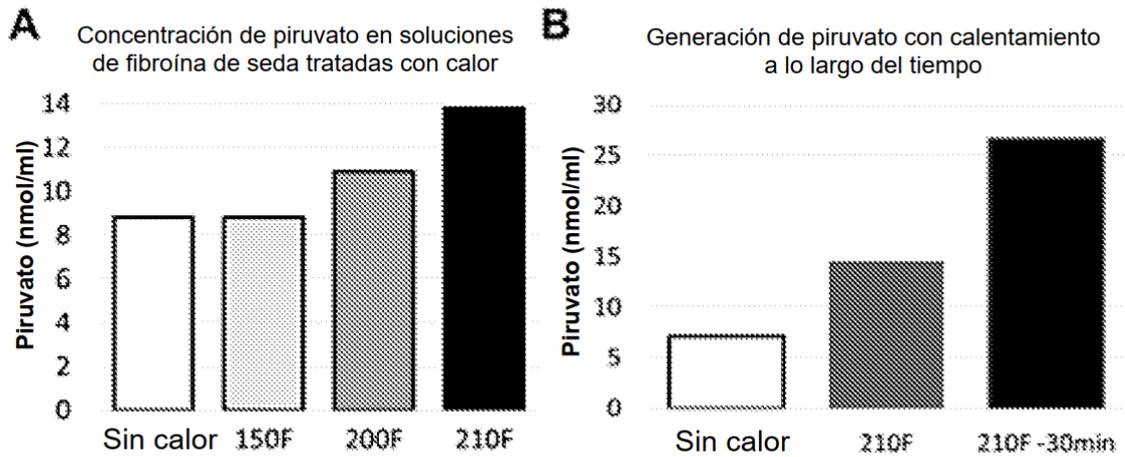
**Fig. 3**



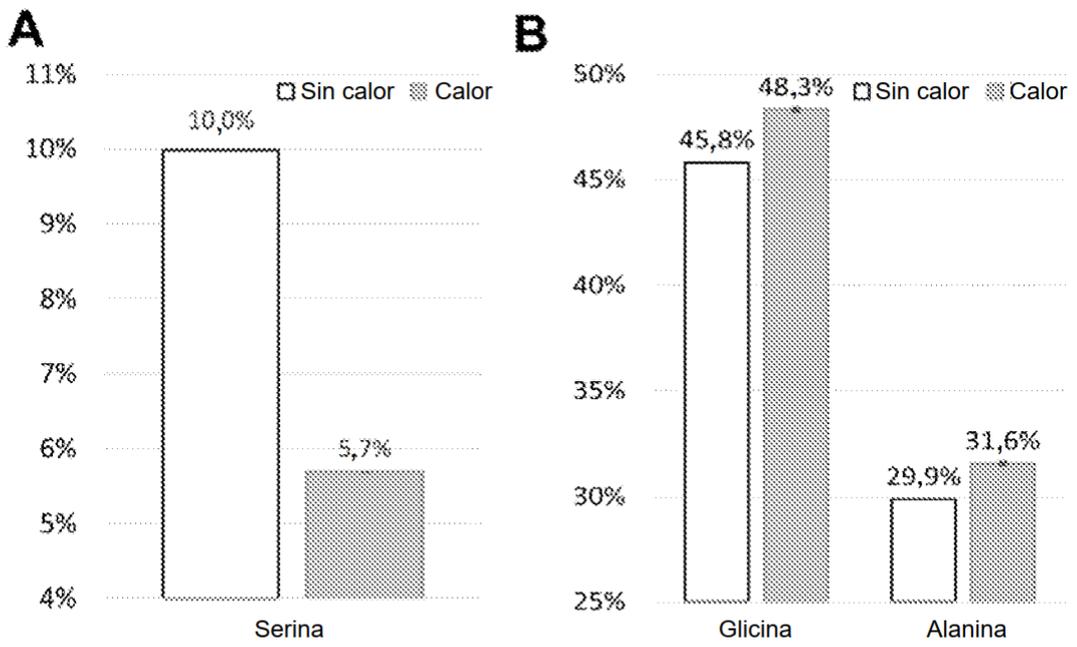
**Fig. 4A-B**



**Fig. 5**



**Fig. 6A-B**



**Fig. 7A-B**

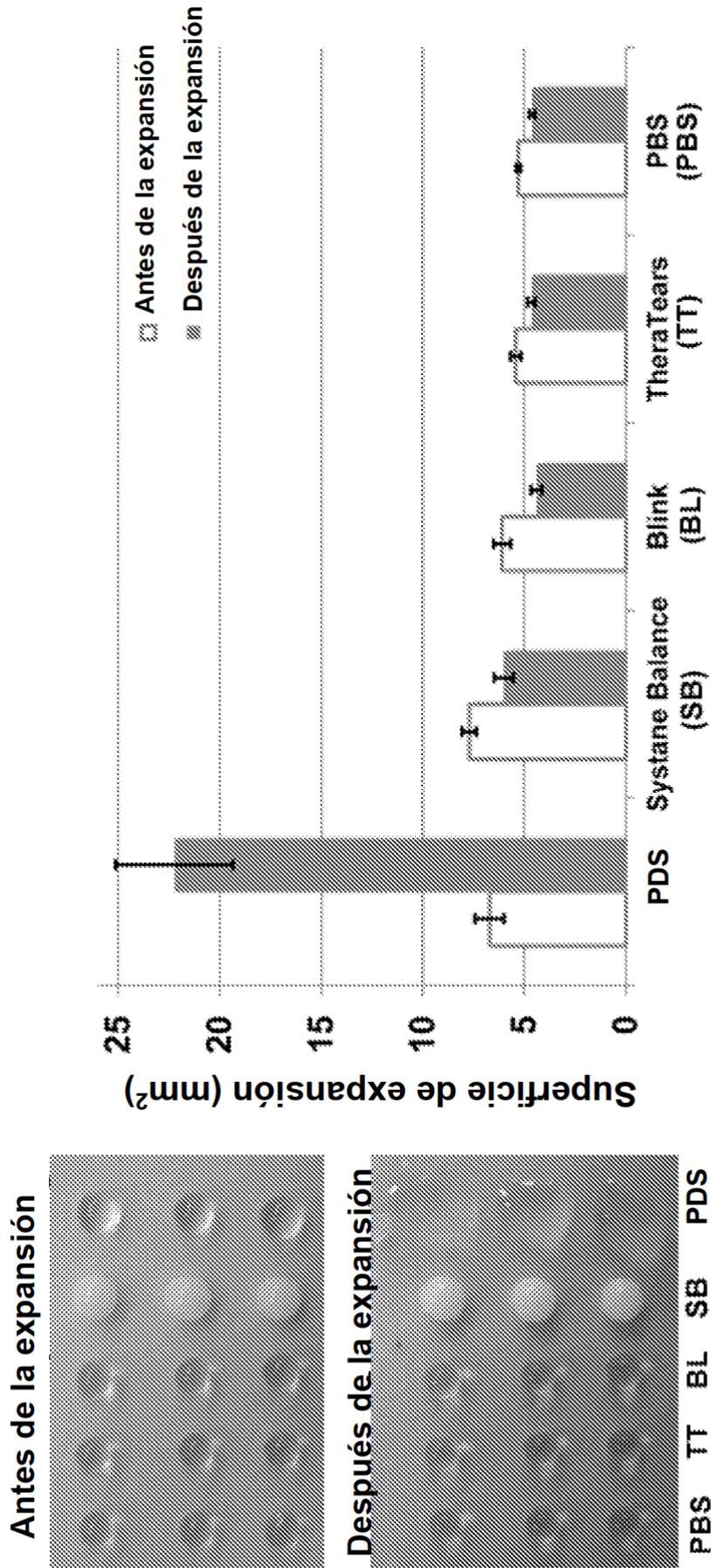
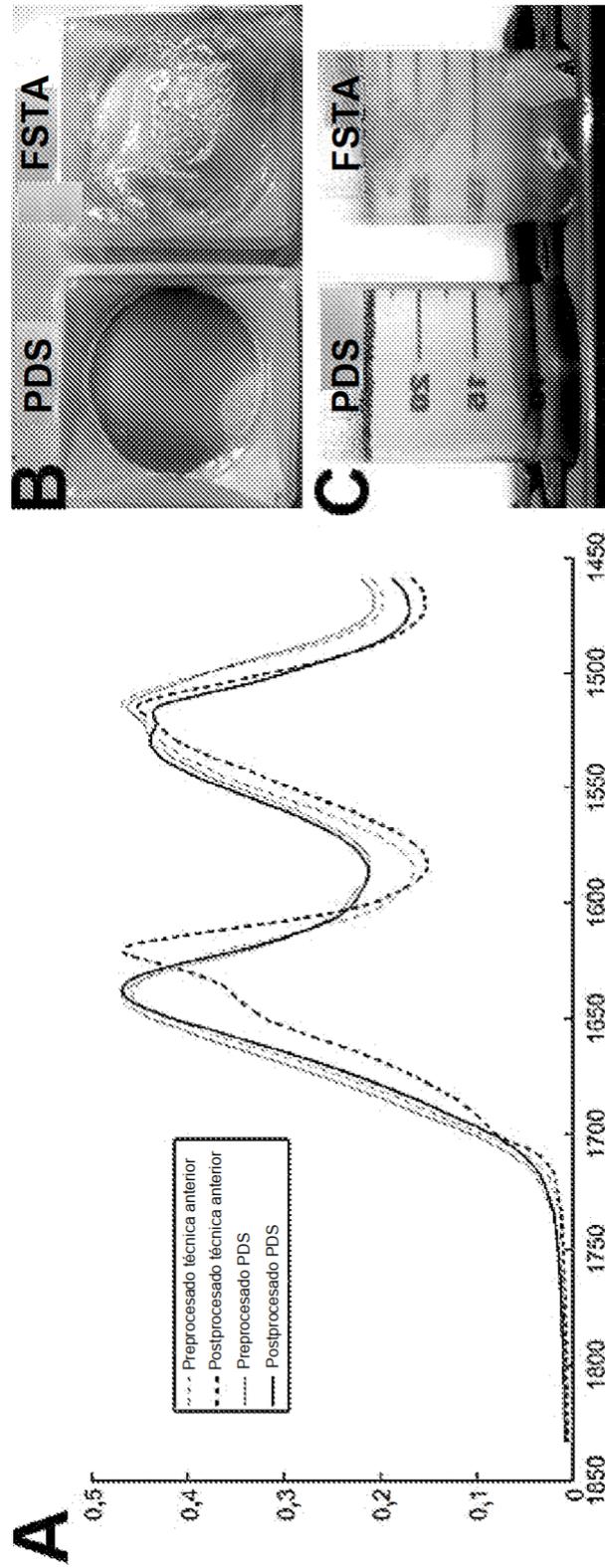
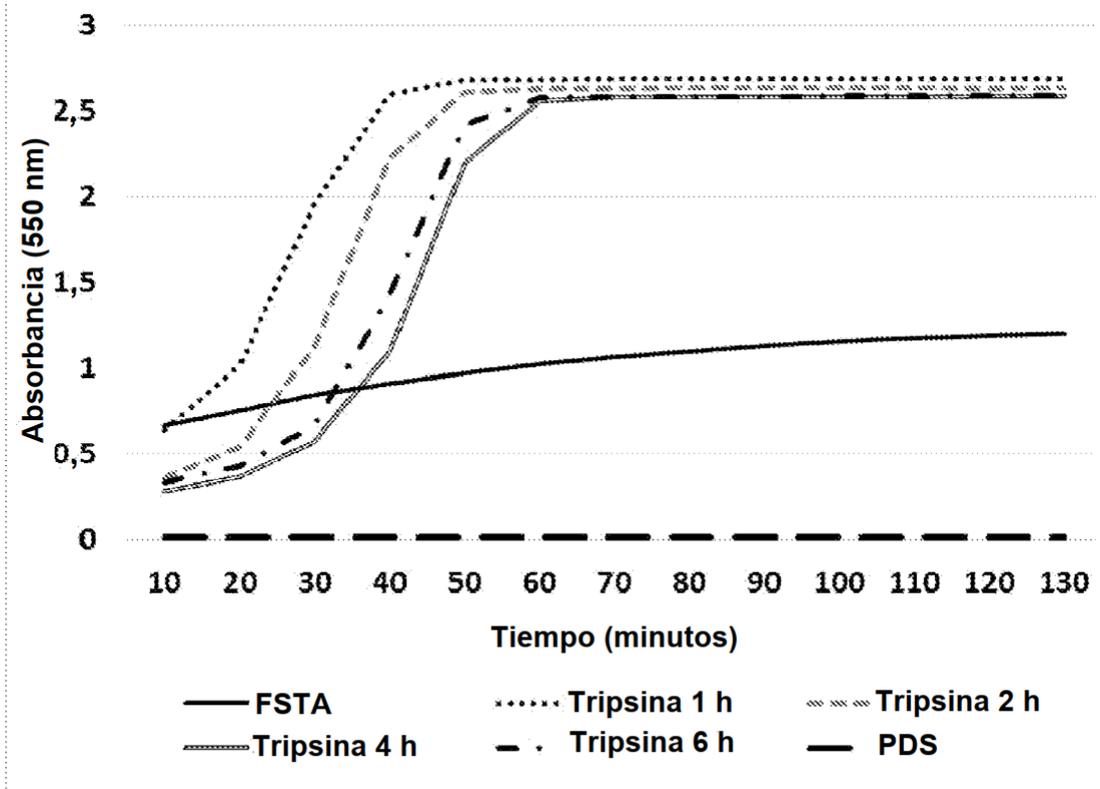


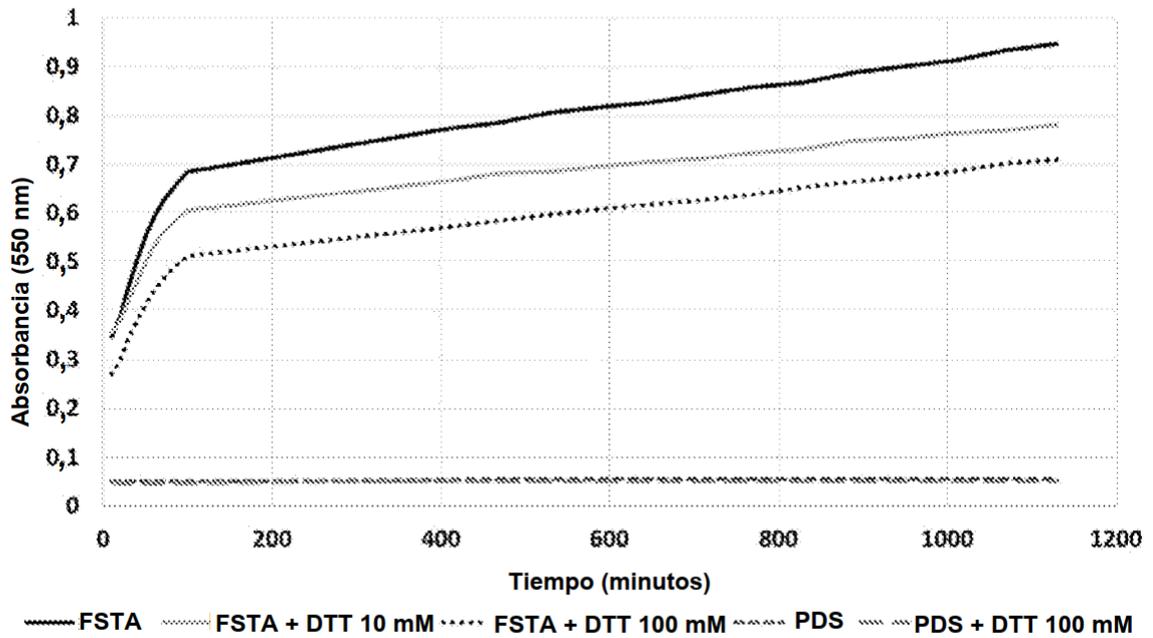
Fig. 8



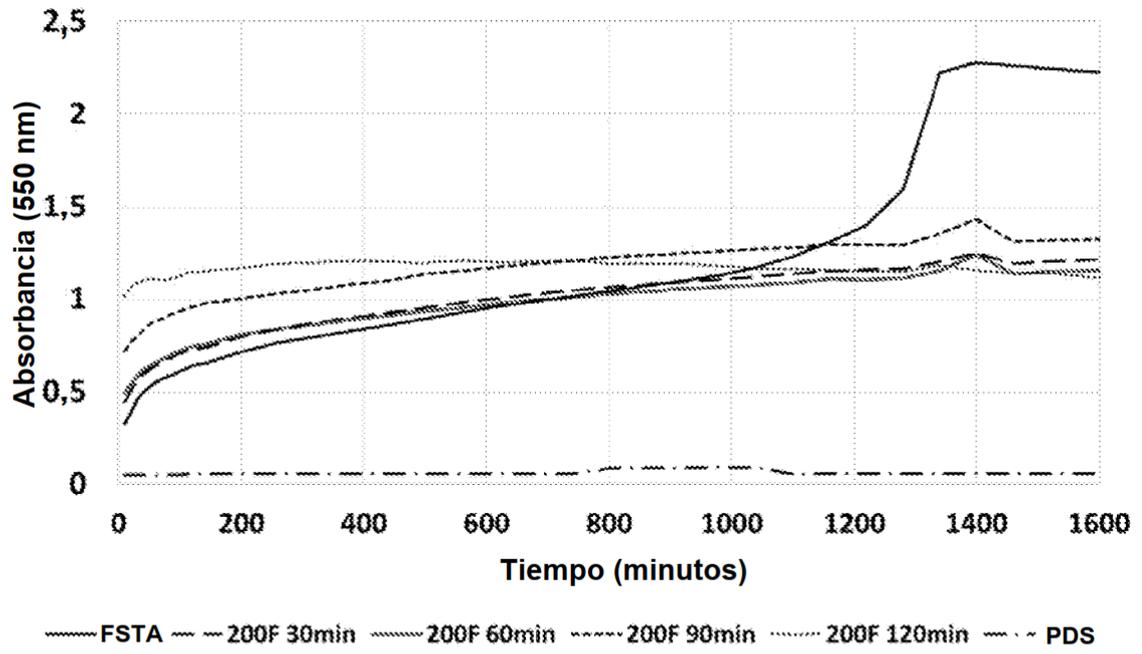
**Fig. 9A-C**



**Fig. 10**



**Fig. 11**



**Fig. 12**