



19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 307 801**

51 Int. Cl.:  
**C07K 14/435** (2006.01)  
**D01D 5/253** (2006.01)  
**D01B 7/00** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **02783023 .1**  
96 Fecha de presentación : **28.10.2002**  
97 Número de publicación de la solicitud: **1440088**  
97 Fecha de publicación de la solicitud: **28.07.2004**

54 Título: **Precursor de la seda para formar filamentos.**

30 Prioridad: **31.10.2001 GB 0126118**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:  
**01.12.2008**

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:  
**01.12.2008**

73 Titular/es: **Spin'tec Engineering GmbH**  
**Dennewartstrasse 25-27**  
**52068 Aachen, DE**

72 Inventor/es: **Vollrath, Fritz**

74 Agente: **Carpintero López, Mario**

ES 2 307 801 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

Precursor de la seda para formar filamentos.

5 **Campo de la invención**

Esta invención se refiere a un material precursor de la seda para hilar fibras proteináceas.

**Técnica anterior**

10 Actualmente, existe mucho interés en un aparato y unos procesos que permitan la fabricación de filamentos poli-  
méricos. Los filamentos fuertes, resistentes son útiles para la fabricación, solamente a modo de ejemplo, de hebras,  
cuerdas, maromas, cintas, materiales devanados, hilados o de vellón. Los filamentos se pueden incorporar también  
15 dentro de una matriz con, o sin otras partículas de relleno para producir unos materiales compuestos resistentes y  
elásticos. Las sedas naturales son unas hebras finas y lustrosas producidas por el gusano de seda, Bombyx Mori, y  
por otros insectos o especies de arácnidos. Dichas sedas ofrecen unas ventajas distintas cuando se comparan con va-  
rios polímeros sintéticos que se usan actualmente para la fabricación de filamentos. La resistencia a la tensión y la  
dureza de algunas sedas pueden igualar e incluso exceder a la de Kevlar<sup>TM</sup>, que es una de las fibras más resisten-  
20 tes hechas por el hombre. Las sedas tales como la de las telas de arañas muestran también una estabilidad térmica  
excepcional. Un número indeterminado de sedas son también biodegradables y no persisten en el medio. Son recicla-  
bles y se fabrican mediante un proceso de baja presión y baja temperatura altamente eficaz que usa solamente agua  
como disolvente. El proceso natural de hilado es excepcional porque una solución acuosa de proteínas se convierte  
en un filamento resistente y altamente insoluble. Existe un número de procedimientos, ya sea convencionales o bio-  
miméticos, para hilar fibras a partir de un material proteínico suministrado a fin de elaborar unas fibras. Todos estos  
25 procedimientos cuentan con un material precursor peptídico, proteínico o proteínico/sintético sintetizado o modificado  
genéticamente.

La seda natural procede comercialmente del gusano de seda, el cual hila un capullo que se va a calentar después y a  
tratar químicamente para permitir que sus filamentos se suavicen y se despeguen, haciendo que sea posible desenredar  
30 el capullo y devanar el filamento resultante sobre una bobina a partir de la cual puedan enrollarse de tal manera que  
se conviertan en hebras. La industria del comercio de la seda tiene una historia de varios miles de años, durante los  
cuales los gusanos de seda (Bombyx Mori) y otras especies de lepidópteros han sido criadas para producir muchas  
especies con sedas de distintas calidades. Recientemente los gusanos de seda Bombyx han sido también modificados  
genéticamente para proporcionar una gama incluso mayor de sedas. No obstante, en todos los casos, el proceso de  
35 hilado del material precursor de la seda se deja al insecto mismo y, de esta manera, el proceso de hilado se desarrolla  
“en vivo”.

Existen varios procesos y procedimientos publicados y conocidos en la técnica para producir unos materiales  
parecidos a la seda o unos materiales derivados de la seda, usando para ello no solo un material precursor de la seda  
40 sintético sino que también un material precursor de la seda recombinado elaborado a partir de unas secuencias de  
seda expresadas por ejemplo en unas bacterias, levaduras, plantas vasculares e incluso en la leche de cabra. Se ha  
sugerido que es probable que dichos materiales puedan tener unas propiedades altamente ventajosas. Se ha sugerido  
también que es probable que se pueda mejorar el rendimiento de dichos materiales haciendo coincidir la tecnología  
de extrusión o moldeo con las propiedades del material precursor de la seda o viceversa. Podrá apreciarse que las  
45 soluciones del material precursor de la seda que se requieran para la fabricación de las fibras deberán tener unas  
propiedades específicas. Existen varias patentes que se refieren a dicho material precursor de la seda, tales como las  
patentes US-A-5.728.810, US-A-5.756.677, US-A-6.268.169 y US-A-6.184.348, las cuales debaten la preparación de  
los polímeros proteínicos de la seda sintética, ya sea mediante modificación genética (recombinante) o química.

50 Existen otras invenciones que debaten la extracción de unos ingredientes particulares tales como la sericina, a partir  
de la seda y de las glándulas productoras de seda para su uso, por ejemplo, en la atención sanitaria y las cremas de  
belleza. Un ejemplo de dicha invención se revela en la solicitud de patente China nº CN-A- 1092284, en la cual se  
corta en pedazos un gusano de seda antes de que sea sumergido en agua. De acuerdo con esta solicitud de patente, una  
multitud de clases de aminoácidos se extraen del gusano de seda los cuales se pueden usar para fabricar un producto  
55 protector de la piel.

Los procedimientos revelados en la técnica anterior para extraer el material precursor de la seda a partir de los  
gusanos de seda, incluyen la solicitud de patente Japonesa nº JP-A-6-184809 (de Saito) en la cual se prensan las larvas  
en el instar final hasta que mueran a fin de extraer el material precursor de la seda de sus glándulas productoras de  
60 seda. No obstante, usando este procedimiento el material precursor de la seda se contamina con los fluidos corporales  
del gusano de seda. La retirada de estos fluidos corporales requiere una etapa adicional de purificación para producir  
un material precursor de la seda para hilaturas u otros procedimientos de extrusión. Incluso después de que el proceso  
de purificación haya sido efectuado, pueden permanecer en el material precursor de la seda algunas impurezas proce-  
dentes de los fluidos corporales que causarán una contaminación que afecte a las propiedades del material final hilado.  
65 Además, dichas purificaciones requieren la adición de unos tratamientos químicos que en todos los casos degradan  
verdaderamente el material precursor de la seda original.

## ES 2 307 801 T3

La solicitud de patente Japonesa nº JP-A-2-686693 (de Asahi Chemical), describe un procedimiento por el cual la fibroína de la seda se cultiva aparentemente usando unas glándulas productoras de seda posteriores en un medio de cultivo.

5 De igual manera, la solicitud de patente Japonesa nº JP-A-3-209399 (de Terumo Corp) describe un procedimiento en el cual se cortan las cabezas de los gusanos de seda y se comprimen sus abdómenes a fin de obtener la proteína de la seda. De nuevo, este procedimiento padece la desventaja de que no solamente se obtienen las proteínas de la seda, sino que también las impurezas de los fluidos corporales lo cual requiere la retirada de la fibroína mediante un procedimiento químico potencialmente nocivo.

10 Unos procedimientos para abrir cortando el gusano de seda para extraer los materiales útiles del gusano de seda, se describen, por ejemplo, en la solicitud de patente Japonesa nº 9-019238 (de Toray Industries). Esta publicación revela una cuchilla ultrasónica la cual abre cortando el gusano de seda a fin de extraer los fluidos corporales, tal como la interferona. Un procedimiento adicional se revela en la solicitud de patente Japonesa nº JP-A-9-070241 (de Toray) en  
15 la cual se usa una cuchilla giratoria para abrir cortando el gusano de seda.

La solicitud de patente Europea nº 0 352 330 A1 (de Terumo) describe el procesamiento de la fibroína moldeada con un agente de reticulación. Esta publicación revela el uso de fibroína purificada y disuelta en unas soluciones acuosas a las que se les añadirá un agente de reticulación.

20 Además, Magoshi y otros, (1994) Mecanismo de formación de fibras a partir de los gusanos de seda, Sym. ACS Serie 544, 292-310), describe un procedimiento para obtener seda líquida de la parte posterior de la división media de una glándula productora de seda y retirar la sericina contenida en la seda líquida con agua desionizada. En uno de los ejemplos, la glándula productora de seda se corta longitudinalmente alrededor de unos 3 cm, mientras que en otro  
25 ejemplo se corta una división anterior de la glándula inmediatamente después de que haya sido extraída del gusano de seda.

### Resumen de la invención

30 Un objeto de la presente invención es el de proporcionar un material precursor de la seda en bruto para su uso en unas operaciones de conformación subsiguientes, extrayendo el material precursor de la seda directamente de las glándulas productoras de seda o de otros artrópodos que producen seda, en el que la glándula tiene una capa epitelial. Al abrir cortando el cuerpo del gusano de seda y retirar la glándula, seguido por la retirada de la capa epitelial y por la extracción de la solución del material precursor de la seda, entonces se reducirá sustancialmente o se evitará totalmente  
35 la contaminación de la solución del material precursor de la seda por otros fluidos corporales. Esto significa que la solución del material precursor de la seda no necesita ser purificada antes de su uso en, por ejemplo, unos procesos de hilado o extrusión. Se cree que el mejor material precursor de la seda en bruto es aquél que está sustancialmente libre de impurezas y además está poco modificado químicamente a partir del material precursor de la seda original que se extrae directamente de las glándulas de los gusanos de seda o de otros artrópodos que producen seda.

40 La solución del material precursor de la seda se puede colocar además, ventajosamente, en agua disuelta durante un período de tiempo a fin de retirar la proteína sericina de la solución del material precursor de la seda. Esto deja una solución de un material precursor de la seda que comprende sustancialmente la proteína fibroína.

45 En una realización adicional de la invención, se trata la solución del material precursor de la seda con un agente de reticulación, tal como un aldehído. El agente de reticulación introduce unos enlaces covalentes entre, y probablemente dentro de las cadenas proteínicas para realzar las propiedades mecánicas del material hilado o extruido, así como del material conformado o vertido en unas conformaciones, según se requiera. Uno de los ejemplos de este uso se muestra en la preparación de un material de relleno, tal como para su inserción dentro de la cavidad de un hueso que  
50 está preparado para un implante, tal como una cadera artificial. Después de la inserción de la espiga de la cadera, se reticulará entonces el material de relleno conformando un hueso ligado y ajustado firmemente y perfectamente conformado y el implante.

### Descripción detallada de la invención

55 La presente invención de refiere a la retirada directa de la solución precursora de la seda, directamente de las glándulas de los gusanos de seda o de otros artrópodos que producen seda. Las glándulas del gusano de seda comprenden una capa epitelial de un tejido que comprende, en gran medida, una capa de células basales rodeadas por una membrana base de proteínas estructurales. Dentro del epitelio existe un revestimiento de sericina compuesto de cinco capas  
60 distintas de sericina, o por el estilo. El revestimiento de sericina rodea un núcleo grueso de fibroína.

Si se desea, la solución precursora se puede recoger, almacenar y someter a una modificación química o física para su uso como un material precursor de la seda suministrado para su extrusión en filamentos, o bien, para moldear el material al mismo tiempo que se asienta para producir unos objetos con una forma deseada. Esto tiene la ventaja de  
65 reducir el costo de la mano de obra comprometida con el trabajo de desenrollar los capullos y es probable que produzca unos materiales con unas propiedades de rango superior. Una ventaja adicional es que, a diferencia del proceso natural de hilado que es extremadamente difícil de controlar, el estudio actual permite efectuar un control riguroso del proceso de extrusión o de moldeo de tal manera que las propiedades de los materiales resultantes puedan, teóricamente, ser

## ES 2 307 801 T3

ajustadas hasta que alcancen el uso final deseado. A modo de ejemplo solamente, el material precursor de la seda de la presente invención se puede usar en unos procedimientos de conformación de materiales según se revela en el documento WO 01/38614 cuya revelación se incorpora en esta solicitud. Parece ser que es muy importante que para que surta el mejor efecto la solución de hilatura tomada de un gusano de seda consiste en que esté libre de impurezas tanto como sea posible y también que se modifique químicamente lo menos posible a partir de la solución original de la seda en bruto.

De esta manera, la invención se refiere a la preparación de unas soluciones de materiales precursores de la seda simplemente retirando las soluciones acuosas de las proteínas de la seda directamente de las glándulas productoras de seda de los gusanos de seda como un precursor desde el cual se puedan extraer o moldear unos materiales. Podrá apreciarse que dicho material precursor de la seda en bruto se puede obtener directamente a partir de las glándulas productoras de seda, ya sea mediante disección o por extracción con un disolvente o con un sistema disolvente apropiado, según se describirá más detalladamente a continuación. Se puede extraer el material precursor de la seda hacia el extremo del instar final de la larva a fin de obtener una cantidad máxima de la proteína fibroína y una cantidad mínima de la proteína sericina. No obstante, se podría extraer el material precursor de la seda en otros instares de las larvas o durante otros períodos de tiempo durante el instar final de las larvas. Las soluciones proteínicas de la seda que han sido extraídas, se pueden diluir, concentrar, modificar química o físicamente, manipular y almacenar fácilmente para su extrusión o moldeo.

Las soluciones proteínicas de la seda que han sido extraídas, comprenden tanto proteínas de sericina como de fibroína. El aditivo de fibroína del Bombyx Mori se puede considerar como una mezcla de tres proteínas, en una proporción de cinco moléculas de fibroína de cadena pesada, 5 moléculas de fibroína de cadena ligera y una molécula de hexamerino (=P25). Se cree que el hexamerino mantiene los hexámeros de las otras dos unidades conformados entre sí, por lo tanto, en una proporción 5.5.1. Es muy probable que estos tengan que ser ensamblados en unas unidades hexaméricas de 5.5.1 para obtener unos resultados óptimos.

La proteína fibroína de cadena pesada ha sido secuenciada y depositada bajo el número de registro FBOH\_BOMMO (P05790) como un precursor de la fibroína de cadena pesada (Fib-H) (Fibroína-H). Está codificada por el gen FIBH-Bombyx Mori (polilla de la seda). La clasificación secuencial se describe en el artículo de Zhou C.-Z, Confalonieri F, Medina N., Zivanovic Y., Esnault C., Yang T., Jacquet M., Janin J., Duguet M., Perasso R., Li z.-G “ Organización fina del gen de la fibroína de cadena pesada del Bombyx Mori” publicado en *Acidos Nucleicos Res.* 28:2413-2419(2000).

La proteína de fibroína de cadena ligera ha sido secuenciada y depositada bajo el número de registro FBOL\_BOMMO (P21828) como un precursor de la fibroína de cadena ligera (Fib-L) (Fibroína-L). Está codificada por el gen FIBL del Bombyx Mori (polilla de la seda). La clasificación secuencial se describe en el artículo de Yamaguchi K., Kikuchi Y., Takagi T., Kikuchi A., Oyama F., Shimura K., Mizuno S., “Estructura primaria de la fibroína de cadena ligera de la seda determinada por el análisis de clasificación secuencial y péptido cDNA”, publicado en *J. Mol. Biol.* 210:127-139(1989). La clasificación secuencial se describe adicionalmente en Kikuchi Y., Mori K., Suzuki S., Yamaguchi K., Mizuno S., “Estructura del gen de codificación de la fibroína de cadena ligera del Bombyx Mori: elementos de la secuencia ascendente comunes a las cadenas ligera y pesada” publicado en *Gene* 110:151-158 (1992).

Se puede usar una amplia variedad de técnicas de extrusión y moldeo para conformar los materiales finales según es conocido comúnmente por una persona experta en la técnica. Unos ejemplos específicos de las etapas adicionales de tratamiento se proporcionarán más detalladamente a continuación.

De acuerdo con otro aspecto de la presente invención está previsto el uso de unas soluciones precursoras de la seda tomadas de las glándulas productoras de seda de los gusanos de seda o de otros artrópodos que producen seda, como un material precursor de la seda, a partir del cual se pueden extraer o moldear unos filamentos u otro tipo de estructuras. En particular, se pueden extraer las glándulas de las larvas del gusano de seda y de otros lepidópteros o arácnidos. El material extraído puede ser extruido transformándolo en unas fibras de alta calidad usando unas tecnologías existentes de hilado y moldeo.

A modo de ejemplo solamente, a continuación se describirá un procedimiento de acuerdo con el cual se puede extraer la solución proteínica. En este procedimiento las glándulas se retiran mediante disección y la solución concentrada de hilatura contenida en las mismas se retendrá, ya sea retirando, o sin retirar, la capa epitelial mediante disección. Las glándulas se retiran abriendo en secciones el cuerpo del gusano de seda o de otros artrópodos productores de seda. El procedimiento preferido practica la retirada de la capa epitelial después de aplicar un breve tratamiento en agua destilada. Alternativamente, se podrían usar también otro tipo de disolventes. La proteína concentrada resultante se puede combinar con otras proteínas extraídas de la misma manera y se puede almacenar, preferiblemente, a una temperatura de 4°C, antes de proceder a su uso. Se pueden añadir unos inhibidores de la proteasa para evitar la degradación de la proteína durante el almacenaje, según es conocido por las personas expertas en la técnica. Se puede instituir un tratamiento con agua o con una solución acuosa para retirar la sericina y otros compuestos fácilmente solubles, antes o después de combinar las glándulas. La solución proteínica concentrada se puede almacenar, preferiblemente, dentro de un recipiente con silicona para evitar su degradación durante el almacenamiento y preferiblemente, bajo un aceite de silicona. Se puede usar directamente la solución proteínica concentrada, o bien, se puede diluir con agua o con otras soluciones o disolventes, antes de proceder a su uso. También puede ser tratada adicional-

## ES 2 307 801 T3

mente o bien, usada directamente. Es posible realizar un almacenamiento prolongado después de liofilizar la solución de hilatura antes o después de su disolución. Unos ejemplos de unas etapas adicionales de tratamiento después de la extracción de la solución proteínica conllevan un tratamiento con unas soluciones acuosas o no acuosas, o con unas soluciones reguladoras, o bien, mediante un tratamiento con los vapores emanados de los ácidos o de las bases, o bien, con las soluciones reguladoras volátiles. Un ejemplo adicional consiste en la adición de iones mono o divalentes para condicionar la solución de hilatura. Estas soluciones condicionantes se pueden añadir a la solución de hilatura a través de una membrana semipermeable o porosa según se describe, por ejemplo, en el documento WO 01/38614.

La solución puede ser tratada añadiendo una solución de un aldehído tal como el glutaraldehído para reticular los constituyentes de la solución de hilatura. Se podrían usar también otros aldehídos o agentes de reticulación según será conocido por las personas expertas en la técnica. Se pueden añadir otros agentes condicionantes a la solución de hilatura.

Se puede lograr el procesamiento final de la solución de hilatura en una variedad de formas. Estas incluyen una solución convencional o unas técnicas de hilatura gelatinizada; de hilatura a través de hileras con una o más regiones semipermeables o porosas; de moldeo; de moldeo por soplado y extrusión por soplado. En una de las realizaciones se puede permitir que la solución fluya dentro de un molde. La solución será tratada después con un aldehído o con otro agente de reticulación en solución o bien, como un vapor aplicado directamente o a través de una membrana semipermeable que conforma sustancialmente todas, o una parte de las paredes del molde. Se puede aplicar un aldehído similar inmediatamente antes de que la solución de hilatura penetre dentro de un molde para ser moldeada por soplado, o de un hilera anular usado para su extrusión por soplado.

### Ejemplos

Dos ejemplos ilustrativos de la invención se describirán ahora. Estos ejemplos no pretenden ser una limitación de la invención.

#### Ejemplo 1

Se selecciona un instar final del gusano de seda Bombyx Mori. El instar tenía una longitud de aproximadamente 7 cm y contenía una glándula con varios miligramos de una mezcla proteínica. El aditivo proteínico contenía fibroína y sericina. Se retiró la glándula diseccionando el gusano de seda. Se tuvo cuidado de evitar una contaminación sustancial con los líquidos corporales del gusano de seda. Después se sumergió la glándula en agua destilada durante dos minutos.

Se retiró el epitelio de la glándula con una cuchilla y se extrajo la mezcla del aditivo proteínico de la glándula. Se fijó la mezcla proteínica en una solución de glutaraldehído al 2% en una solución reguladora de 0,1 M fosfato, que tenía un pH de 7,4, durante doce horas. La mezcla reticulada resultante parecía tener unas propiedades mecánicas excelentes.

#### Ejemplo 2

Se retiraron las glándulas según se ha descrito anteriormente y se retiró también el epitelio. La mezcla proteínica se colocó dentro de agua destilada y se agitó durante unos 30 minutos. Se disolvió la proteína sericina en agua destilada para dejar, sustancialmente, solo la proteína fibroína en la mezcla proteínica. La proteína fibroína fue transferida seca y se colocó dentro de un molde para su almacenamiento.

# ES 2 307 801 T3

## REIVINDICACIONES

- 5 1. Un procedimiento para obtener una solución de un material precursor de la seda a partir de una glándula de un gusano de seda o de otro artrópodo productor de seda, en el que la glándula tiene una capa epitelial que comprende:
- una primera etapa que consiste en abrir cortando el cuerpo del gusano de seda o de otro artrópodo productor de seda;
  - 10 - una segunda etapa que consiste en retirar la glándula;
  - una tercera etapa que consiste en retirar la capa epitelial; y
  - una cuarta etapa que consiste en extraer la solución del material precursor de la seda, de la glándula.
- 15 2. El procedimiento de acuerdo con la Reivindicación 1, en el que se retira la capa epitelial mediante disección antes de la etapa de extracción de la solución del material precursor de la seda.
- 20 3. El procedimiento de acuerdo con la Reivindicación 2, en el que se trata la glándula con agua, preferiblemente, con agua destilada o con otro disolvente, antes de retirar la capa epitelial.
4. El procedimiento de acuerdo con una cualquiera de las Reivindicaciones anteriores, en el cual se trata la solución del material precursor de la seda con un agente de reticulación.
- 25 5. El procedimiento de acuerdo con la Reivindicación 4, en el que el agente de reticulación es un aldehído.
6. La solución del material precursor de la seda obtenida a partir de un gusano de seda o de otro artrópodo productor de seda, usando el procedimiento de una de las Reivindicaciones 1 a 5.
- 30 7. La solución del material precursor de la seda de acuerdo con la Reivindicación 6, que comprende sustancialmente la proteína fibroína.
8. El uso de la solución del material precursor de la seda de acuerdo con las Reivindicaciones 6 ó 7, a partir de la cual se pueden extruir o moldear unos objetos.
- 35 9. El uso de un agente de reticulación para tratar una solución precursora de la seda que ha sido extraída de acuerdo con el procedimiento descrito en una cualquiera de las Reivindicaciones 1 a 5, a partir de las glándulas de los gusanos de seda y de otros artrópodos productores de seda, como una solución de un material precursor de la seda a partir de la cual se pueden extruir o moldear unos objetos o asientos para objetos.
- 40 10. El uso de la Reivindicación 9, en la que el agente de reticulación es un aldehído.
11. Un procedimiento para conformar un material hilado haciendo pasar una solución de hilatura líquida a través de un conducto de un conjunto de hilera para convertir la solución de hilatura líquida en un material sólido, en el que la solución de hilatura líquida se proporciona extrayendo la solución del material precursor de la seda de las glándulas de los gusanos de seda o de otros artrópodos productores de seda, de acuerdo con el procedimiento de una de las Reivindicaciones 1 a 5.
- 45 12. El procedimiento de acuerdo con la Reivindicación 11, que comprende además una etapa de tratamiento químico de la solución del material precursor de la seda antes de que pase a través del conducto del conjunto de hilera.
- 50 13. El procedimiento de acuerdo con la Reivindicación 12, en el que la etapa de tratamiento de la solución del material precursor de la seda comprende la adición de un agente de reticulación.

55

60

65