

(19)



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS
ESPAÑA



(11) Número de publicación: **2 994 770**

(51) Int. Cl.:

A61L 27/24 (2006.01)
A61L 27/50 (2006.01)
A61L 27/52 (2006.01)
A61L 27/54 (2006.01)
B33Y 80/00 (2015.01)

(12)

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

(96) Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **21.03.2023 E 23163298 (5)**

(97) Fecha y número de publicación de la concesión europea: **18.09.2024 EP 4249008**

(54) Título: **Composición de biotinta a base de colágeno equino de tipo I, proceso para su preparación y sus usos**

(30) Prioridad:

21.03.2022 IT 202200005534

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

31.01.2025

(73) Titular/es:

TYPEONE BIOMATERIALS S.R.L. (100.00%)
Via Europa, 167
73021 Calimera (LE), IT

(72) Inventor/es:

SALVATORE, LUCA;
NATALI, MARIA LUCIA y
GALLO, NUNZIA

(74) Agente/Representante:

TORNER LASALLE, Elisabet

ES 2 994 770 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 de biotinta a base de colágeno equino de tipo I, proceso para su preparación y sus usos

Sumario de la invención

El contenido de la presente invención es una composición de biotinta a base de colágeno equino de tipo I, un proceso para su preparación y sus usos en terapia y cirugía.

Antecedentes técnicos

La tecnología de impresión 3D permite la creación con alta precisión de constructos tridimensionales con complejidades geométricas variables y personalizables. Recientemente se ha venido prestando mucha atención a la impresión tridimensional para la producción de tejidos/órganos funcionales para aplicaciones biomédicas y para el modelado celular *in vitro*. La capacidad de producir dispositivos médicos implantables que puedan personalizarse a las necesidades específicas de cada paciente en términos de estructura anatómica y patología/traumatismo hace que la impresión tridimensional sea incuestionablemente beneficiosa. Además, la capacidad de reproducir *in vitro* un tejido humano en su conformación tridimensional nativa permite la creación de un modelo celular que es capaz de reflejar más estrechamente las complejas respuestas celulares del mundo real que los cultivos y modelos animales en dos dimensiones. Por tanto, la impresión 3D mantiene un lugar prominente entre todos los procedimientos de producción de andamios, ya que tiene el potencial de salvar la divergencia entre constructos diseñados y tejidos nativos.

Hay en la actualidad dos planteamientos para producir constructos tridimensionales: *in vitro* e *in situ*. En el caso de la impresión tridimensional *in vitro*, la deposición de materiales tiene lugar en entornos de laboratorio. Solo tras su impresión se usa el constructo para estudios celulares *in vitro* o para su implantación en un modelo animal. En el caso de la impresión tridimensional *in situ*, la deposición de materiales se lleva a cabo directamente en el sitio de interés del modelo animal y/o humano.

Con independencia del planteamiento de impresión tridimensional hay diferentes tipos de técnicas, de las cuales las más populares son las basadas en la inyección por chorro de tinta, las asistidas por luz y las basadas en la extrusión. La impresión por chorro de tinta (el primer tipo de impresión desarrollado) usa una impresora de chorro de tinta capaz de extender microgotitas de células y biomateriales por medios térmicos, piezoelectrónicos o acústicos. La impresión mediada por energía lumínica se basa en la aplicación de energía lumínica para inducir la polimerización de una tinta fotopolimerizable especial y puede subdividirse en tres tipos: LIFT (transferencia directa inducida por láser, por sus siglas en inglés), SLA (estereolitografía, por las siglas en inglés de aparato de estereolitografía) y DLP (proyección digital de luz, por sus siglas en inglés). La impresión por extrusión permite generar estructuras tridimensionales por deposición de tinta por extrusión a través de una boquilla sobre un soporte aplicando presión. Aunque se han desarrollado técnicas nuevas (por ejemplo, impresión sin contacto e impresión volumétrica), la extrusión sigue siendo la técnica usada de forma más generalizada tanto en la investigación como en áreas comerciales, porque es sumamente económica, accesible y permite que la complejidad de los tejidos biológicos sea duplicada muy estrechamente. Las principales ventajas de la impresión por extrusión, en comparación con otras técnicas, son debidas a la capacidad de usar una amplia variedad de biomateriales y tipos de células, para depositar con éxito biomateriales con la densidad celular deseada y para reducir el daño celular inducido por el proceso de impresión en comparación con otras técnicas. Aunque tiene algunas limitaciones, tales como la gama de biotintas disponibles y la resolución de los filamentos (normalmente superior a 100 mm), las ventajas asociadas con los aspectos económicos y la disponibilidad comercial han hecho de la extrusión la técnica más popular entre los ingenieros y los investigadores. Las biotintas comunes incluyen hidrogeles de alginato, colágeno, gelatina, celulosa, fibroína y una matriz extracelular descelularizada. Entre las diversas biotintas, se considera al colágeno el biomaterial preferido. La mayoría de las tintas a base de colágeno están constituidas por colágeno de tipo I, proteína con función principalmente estructural que constituye aproximadamente el 90% de la masa proteica de los tejidos conjuntivos en mamíferos. Las biotintas de colágeno de tipo I, fundamentalmente del tipo "soluble" y aisladas del tendón de la cola de ratas o de la dermis bovina/porcina, consisten en suspensiones acuosas ácidas de colágeno que, en condiciones fisiológicas (pH neutro, 37°C), se coagulan debido a la capacidad de las moléculas de colágeno de autoorganizarse formando fibrillas. La capacidad de impresión de una biotinta a base de colágeno depende de la cinética de este proceso (gelificación): cuanto mayor sea la velocidad, mayor será la precisión de la impresión. Desgraciadamente, modular tal cinética no es simple. Además, la estrecha ventana de tiempo y la total inestabilidad con el tiempo hacen que el aprovechamiento de esta propiedad no siempre sea óptima ni regulable. Algunas formulaciones, por otro lado, presentan una cinética de gelificación excesivamente lenta, por lo que el material extrudido no conserva su forma y el constructo tridimensional final no tiene alta definición. Además de estos problemas, se ha demostrado que las biotintas a base de colágeno tienen una capacidad de impresión deficiente debido a sus pobres propiedades mecánicas. Para implementar las propiedades y la capacidad de impresión de las formulaciones a base de colágeno, se han desarrollado varias estrategias, como la hibridación con otros materiales/polímeros (por ejemplo, glucosaminoglicanos, fosfatos tricálcicos, metacrilato de poliglicerol), exposición a reticulantes físicos (por ejemplo, luz UV, calor) o químicos (por ejemplo, mediante el uso de boquillas coaxiales que proporcionan simultáneamente biotinta o disolución reticulante), y el procesamiento a bajas temperaturas o altas concentraciones de polímeros. El procesamiento a bajas temperaturas permite aumentar la viscosidad de la biotinta

y, en consecuencia, imprimir estructuras sólidas. Sin embargo, aparte del hecho de que algunas formulaciones con baja concentración de biopolímeros permanecen en estado líquido incluso a bajas temperaturas, tales planteamientos pueden poner en peligro la impresión de estructuras avanzadas con células o moléculas bioactivas. De hecho, a diferencia de los planteamientos *in vitro* que se logran con éxito trabajando a bajas temperaturas, los planteamientos *in vivo* requieren una temperatura de aproximadamente 37°C (así como un pH neutro). En paralelo a los estudios basados en la reducción de la temperatura, una cantidad considerable de trabajo ha buscado mejorar la capacidad de impresión de las suspensiones de colágeno mejorando su módulo de almacenamiento ($\sigma G'$), ya que el comportamiento del material depende muchísimo de tal parámetro. En particular, una suspensión polimérica tiende a comportarse como un sólido elástico cuando el módulo de almacenamiento G' es significativamente mayor que el módulo de pérdida G'' , haciéndola particularmente adecuada para su uso en procesos de impresión, mientras que, por otro lado, presenta un comportamiento de tipo fluido fundamentalmente viscoso cuando está caracterizada por una componente de pérdida mayor que la de almacenamiento, haciéndola inadecuada para la impresión en este caso. El módulo de almacenamiento depende de la concentración de sales en la suspensión, de la temperatura y de la concentración de colágeno. El procedimiento más eficaz para aumentar el módulo de almacenamiento es aumentar la concentración de colágeno. Por lo general, las suspensiones de colágeno tienen una concentración baja, habitualmente no más de 5 mg/ml y rara vez 10 mg/ml (más del 90% de los estudios conocidos se han llevado a cabo usando hidrogeles de colágeno preparados a partir de soluciones con no más de 10 mg/ml de colágeno). Únicamente las altas concentraciones de colágeno (20 mg/ml o superiores) permiten un módulo de almacenamiento mucho mayor que el módulo de pérdida y que, por tanto, aumente la precisión de impresión.

Además de los planteamientos anteriormente mencionados, se ha desarrollado recientemente una nueva tecnología denominada FRESH (incrustación reversible de forma libre de hidrogeles suspendidos, por sus siglas en inglés) que permite el uso de suspensiones ácidas de colágeno que tienen baja viscosidad para el desarrollo de constructos tridimensionales por gelificación instantánea en un tampón apropiado de neutralización y, por tanto, permite que se expanda la disponibilidad de biotintas a base de colágeno.

Por lo tanto, se entiende que biotintas a base de colágeno conocidas están constituidas por suspensiones ácidas de colágeno a bajas concentraciones, generalmente en torno al 0,5% y en raros casos hasta del 1%, que deben luego ser neutralizadas *in situ* usando soluciones tampón específicas o requerir tratamientos terminales para una reticulación posterior a la impresión para estabilizar definitivamente su estructura.

NOCERA ADEN DÍAZ Y OTROS: "Development of 3D printed fibrillar collagen scaffold for tissue engineering", BIOMEDICAL MICRODEVICES, SPRINGER US, NEW YORK, vol. 20, nº 2, 27 de febrero de 2018 (2018-02-27), páginas 1-13, dan a conocer un andamio impreso usando una biotinta de colágeno bovino de tipo I que tiene propiedades de aclaramiento de cizalladura a una concentración del 6% p/v, pH 7 en tampón fosfato salino (PBS, por sus siglas en inglés). El andamio impreso no requiere reticulación.

Por lo tanto, existe la necesidad de nuevas composiciones a base de colágeno que puedan usarse como biotintas que sean adecuadas para la producción *in vitro* e *in situ* de constructos tridimensionales y sean compatibles con varios sistemas y tecnologías de impresión que superen los inconvenientes de la técnica conocida y sean estables en un entorno fisiológico.

Objetos de la invención

Un primer objeto de la invención es proporcionar una composición de biotinta de colágeno adecuada para la producción *in vitro* e *in situ* de constructos tridimensionales y compatible con sistemas y tecnologías convencionales de impresión.

Otro objeto de la invención es proporcionar una composición de biotinta que tiene pH neutro, condición óptima para su inclusión en células antes de la impresión, y propiedades químicas y físicas específicas gracias a las cuales es estable en un amplio intervalo de temperaturas, en particular a 37°C, y no precisa soluciones tampón para su gelificación.

Otro objeto de la invención es proporcionar una composición de biotinta que contiene un colágeno caracterizado por una elevada conservación de su organización jerárquica nativa. Otro objeto de la invención es proporcionar una composición de biotinta caracterizada por propiedades reológicas óptimas para su uso en aplicaciones de impresión tridimensional con tecnología de extrusión.

Otro objeto de la invención es proporcionar un proceso de preparación del colágeno contenido en la composición de biotinta de la invención, así como del colágeno así obtenido.

Por último, un objeto adicional de la invención está dirigido a la composición de la invención para su uso en terapia y cirugía.

Tales objetos se logran por la presente invención, que proporciona una composición de biotinta de colágeno según la reivindicación 1, un proceso para su preparación según la reivindicación 8, una composición según la reivindicación 12 y un procedimiento de impresión tridimensional según la reivindicación 13.

Breve descripción de las Figuras

La Figura 1 muestra el diagrama de flujo del proceso de producción de la composición de biotinta de la invención.

5 La Figura 2 muestra el patrón electroforético de la composición de biotinta de la invención (columna 2) comparado con el del colágeno de tipo I nativo (columna 3). En la columna 1 se muestran como estándares de referencia proteínas con pesos moleculares conocidos entre 10 y 250 kDa.

10 La Figura 3 muestra a la izquierda el patrón de bandas de la composición de biotinta de la invención. A la derecha se representa el patrón de bandas del colágeno de tipo I nativo.

10 La Figura 4 muestra el potencial zeta de la composición de biotinta de la invención (línea negra) comparado con el del colágeno de tipo I nativo (línea gris), en función del pH (3,5<pH<4,5).

15 La Figura 5 muestra a la izquierda la tendencia de la viscosidad de la composición de biotinta de la invención (línea negra) comparada con la del colágeno de tipo I nativo (línea gris), pudiéndose ver el típico comportamiento pseudoplástico de "aclaramiento de cizalladura" de la propia biotinta, que puede ser modelado según la ley de

potencia o ecuación de Ostwald-de Waele $\eta = \frac{\tau}{\dot{\gamma}} = m(\dot{\gamma})^{n-1}$, siendo n<1. A la derecha se representan el módulo

20 de almacenamiento G' (línea negra continua) y el módulo de pérdida G" (línea negra discontinua) de la invención y el módulo de almacenamiento G' (línea gris continua) y el módulo de pérdida G" (línea gris discontinua) del colágeno de tipo I nativo.

25 La Figura 6 muestra a la izquierda el módulo de almacenamiento G' (línea negra continua) y el módulo de pérdida G" (línea negra discontinua) de la invención y el módulo de almacenamiento G' (línea gris continua) y el módulo de pérdida G" (línea gris discontinua) del colágeno de tipo I nativo en función del esfuerzo de cizalladura. A la derecha se representan la tangente de pérdida G"/G' de la invención (línea negra continua) y la del colágeno de tipo I nativo (línea gris).

30 La Figura 7 muestra el termograma de la composición de biotinta de la invención (línea negra) comparado con el del colágeno de tipo I nativo (línea gris), pudiéndose ver que el material es térmicamente estable hasta 40-42°C; es decir, hasta esta temperatura no se produce ningún fenómeno endo/exotérmico al calentar.

Descripción de la invención

Según uno de sus aspectos, el contenido de la invención es una composición de biotinta que comprende colágeno equino de tipo I, caracterizada porque

35 a. dicho colágeno equino de tipo I está en suspensión y tiene un peso molecular promedio en peso de las cadenas $\alpha_1(I)$ y $\alpha_2(I)$ que oscila entre 120 y 200 kDa;

b. el pH de dicha composición está entre 7,0 y 7,6;

c. dicha composición es pseudoplástica.

40 Preferiblemente, dicho colágeno equino de tipo I está en forma de fibras y presenta el típico patrón de bandas del colágeno nativo con un periodo de 67 nm.

Según una realización preferida, la composición de la invención es una suspensión acuosa en la que el colágeno está suspendido en un líquido seleccionado entre un tampón farmacéuticamente aceptable, preferiblemente un tampón fosfato salino, y una solución fisiológica de cloruro sódico al 0,9% p/v.

45 Según una realización preferida, la composición de la invención es una suspensión acuosa en la que el colágeno está suspendido a una concentración del 0,5 al 4,0% p/v, preferiblemente del 1,0 al 3,0% p/v.

Según una realización preferida, la composición de la invención tiene una viscosidad η que tiene valores entre 1 y 10000 Pa·s para tasas de deformación de 0,1 Hz, y entre 0,01 y 100 Pa·s para tasas de deformación de 100 Hz. Preferiblemente, la composición de la invención tiene una viscosidad η que tiene valores entre 5 y 5000 Pa·s para tasas de deformación de 0,1 Hz, y entre 0,1 y 10 Pa·s para tasas de deformación de 100 Hz.

50 Según una realización preferida, la composición de la invención tiene un módulo de almacenamiento G' mayor que el módulo de pérdida G". Según una realización preferida, la composición de la invención tiene un módulo de almacenamiento G' que tiene valores entre 1 y 10000 Pa para frecuencias de 0,1 Hz, y entre 10 y 10000 Pa para frecuencias de 10 Hz, y un módulo de pérdida G" que tiene valores entre 0,1 y 1000 Pa para frecuencias de 0,1 Hz, y entre 1 y 1000 Pa para frecuencias de 10 Hz. Preferiblemente, la composición de la invención tiene módulo de almacenamiento G' que tiene valores entre 5 y 5000 Pa para frecuencias de 0,1 Hz, y entre 50 y 5000 Pa para

frecuencias de 10 Hz, y un módulo de pérdida G'' que tiene valores entre 0,5 y 500 Pa para frecuencias de 0,1 Hz, y entre 5 y 500 Pa para frecuencias de 10 Hz.

Según una realización preferida, la composición de la invención tiene una tangente de pérdida (G''/G') entre 0,05 y 0,5 para esfuerzos de cizalladura entre el 0,01% y el 10%. Preferiblemente, la composición de la invención tiene una tangente de pérdida que tiene valores entre 0,1 y 0,3 para esfuerzos de cizalladura entre el 0,01% y el 10%.

Más específicamente, se observó que es ventajoso que haya un equilibrio entre las dos componentes, dado que el material debe ser imprimible (es decir, debe fluir a través de la boquilla) y, al mismo tiempo, debe conservar su forma después de la impresión. Se obtiene una buena solución de compromiso entre las dos componentes cuando la relación (o tangente de pérdida) G''/G' es de aproximadamente 0,1-0,3.

10 El término "pseudoplástico" es muy conocido para el experto en la técnica y a menudo se lo denomina con la expresión "aclaramiento de cizalladura".

Según una realización preferida, la composición de biotinta que comprende colágeno equino de tipo I se caracteriza porque

15 – en dicha composición $G' > G''$ y la relación G''/G' está preferiblemente entre 0,1 y 0,3;

– el pH de dicha composición está entre 7,0 y 7,6;

– dicha composición es pseudoplástica;

20 – dicho colágeno equino de tipo I está en suspensión y tiene un peso molecular promedio en peso de las cadenas $\alpha_1(I)$ y $\alpha_2(I)$ que oscila entre 120 y 200 kDa; y

– dicho colágeno equino de tipo I está en forma de fibras y presenta el típico patrón de bandas del colágeno nativo con un periodo de 67 nm.

25 A diferencia de las composiciones conocidas de biotinta de colágeno, la composición de la invención está constituida exclusivamente por colágeno equino de tipo I, queriendo decir "constituida exclusivamente por colágeno equino de tipo I" que no requiere aditivos, neutralizantes, reticulantes y similares, que, en cambio, son requeridos para la estabilización y la impresión de las composiciones de biotinta de la técnica anterior. Además, y ello es de importancia capital, la composición de la invención no precisa ser mezclada con otros copolímeros (o materiales base) para mejorar su rendimiento; sin embargo, aunque no sea necesario, si se desea, tal mezcla puede seguir realizándose.

Antes de ser sometida a impresión, la composición de la invención puede ser cargada con componentes útiles para su uso previsto.

35 Según una realización, la composición de la invención también comprende al menos un agente biológico adicional, incluyendo la expresión "agente biológico", sin limitación, agentes terapéuticos, fármacos, factores de crecimiento, proteínas, células y mezclas de los mismos. En general, en la composición de la invención puede incluirse cualquier tipo celular o mezcla celular "adherente" perteneciente a una línea inmortalizada o primaria (que comprenda células madre y células diferenciadas pluripotentes, multipotentes y unipotentes), gracias al hecho de que dicha composición tiene propiedades adecuadas para soportar y promover procesos celulares y no precisa tratamientos exógenos - tales como, por ejemplo, irradiación UV o la adición de aditivos/reticulantes dañinos/tóxicos - que causarían la alteración/degradación de las moléculas cargadas y/o el sufrimiento o la muerte celular.

A título de ejemplo, la composición de biotinta de la invención ha sido objeto de impresión con éxito con células endoteliales, fibroblastos, una mezcla de células endoteliales y fibroblastos, y mioblastos.

45 Según la invención, el colágeno equino de tipo I (en lo sucesivo en este documento también simplemente "colágeno") es acilado y tiene grupos carboxilo libres. Según una realización, el colágeno es acilado por reacción con un anhídrido cíclico, preferiblemente, pero no únicamente, anhídrido succínico o anhídrido glutárico. La reacción de acilación con anhídridos cílicos convierte en grupos amido los grupos amino ε básicos de los residuos de lisina en el colágeno y proporciona grupos ácidos libres. Se ha observado que alterar la carga neta de la proteína (una carga positiva es sustituida con una unidad de carga negativa) vuelve el colágeno polianiónico a pH fisiológico; es decir, desplaza su punto isoeléctrico, en este caso específico, de un valor de aproximadamente 5,5 a un valor entre 3,5 y 4,5 (véase la Figura 4).

55 El fin para el cual se efectúa la acilación con anhídridos cílicos es, precisamente, volver el colágeno polianiónico a pH fisiológico; esto permite crear suspensiones de colágeno homogéneas y estables a tales valores de pH. Sin embargo, al mismo tiempo, puede resultar importante que el colágeno conserve grupos amino libres disponibles para una posible reticulación adicional posterior a la síntesis. Por lo tanto, aunque para la acilación se usa preferiblemente una cantidad de anhídrido cíclico superior al número teórico de aminas libres, preferiblemente la

reacción de acilación no debe llegar a su término. El experto en la técnica es absolutamente capaz de gestionar la reacción para lograr este resultado.

Según una realización preferida, la composición de la invención se caracteriza por

- un pH neutro, condición óptima para la inclusión de células antes de la impresión;
- 5 – propiedades químicas y físicas específicas, gracias a las cuales es estable en un amplio intervalo de temperaturas (por ejemplo, a 37°C, otra condición óptima para el trabajo con células) y no precisa disoluciones tampón (para que tenga lugar la gelificación);
- 10 – propiedades reológicas óptimas para la impresión tridimensional (especialmente para tecnología de extrusión). Por tanto, gracias a las propiedades del colágeno adquiridas por el tratamiento de acilación descrito anteriormente con anhídridos cílicos, así como las otras propiedades anteriormente enumeradas de la composición, es posible imprimir directamente la composición de la invención a pH neutro y temperatura corporal y sin la necesidad de un tampón de neutralización, aditivos o ningún reticulante químico. Esta característica del colágeno también permite la inclusión en la composición de la invención de células o factores moleculares que pueden ser impresos sin ser dañados.

La composición de la invención también se caracteriza por propiedades reológicas óptimas que la hacen compatible con las tecnologías de bioimpresión y, preferiblemente, con sistemas de impresión por extrusión más generalizados.

Según una realización preferida, la tecnología de impresión tridimensional para la composición de la invención se basa en procesos de extrusión. Se ha observado que la deposición puede realizarse con éxito para temperaturas entre 4°C y 37°C, preferiblemente con una extrusora de agujas que tengan un diámetro, por ejemplo, de 0,15-1,20 mm, y con velocidades de extrusión, por ejemplo, de 5 a 50 mm/minuto. Sin embargo, las condiciones en términos de flujo/velocidad dadas anteriormente pueden personalizarse en función de la viscosidad de la formulación, que puede cambiarse según la aplicación para la que esté prevista. El experto en la técnica es ciertamente capaz de seleccionar las mejores condiciones de impresión tridimensional a partir de la información proporcionada en el presente documento y de su conocimiento general.

La composición de la invención es un material viscoelástico, más precisamente un líquido no newtoniano del tipo de aclaramiento de cizalladura o pseudoplástico (su viscosidad – aparente - disminuye a medida que aumenta la tasa de deformación). Por tanto, su comportamiento puede ser descrito por una ecuación de tipo "ley de potencia" o de

30 Ostwald-de Waele $\eta = \frac{\tau}{\dot{\gamma}} = m(\dot{\gamma})^{n-1}$, siendo n<1. Por lo tanto, los parámetros más importantes desde el punto de vista reológico y dinámico-mecánico para la caracterización de materiales son la viscosidad y los módulos G' (módulo de almacenamiento, que representa la componente elástica del material) y G" (módulo de pérdida, que representa la componente viscosa del material). Tales parámetros se miden de una manera conocida en la técnica, por ejemplo, mediante análisis dinámico-mecánico con la ayuda de un reómetro de platos paralelos. La medición de tales parámetros se llevó a cabo mediante un reómetro rotacional de platos paralelos con un diámetro de plato de 2,5 cm (reómetro oscilador de alta resolución StressTech HR — REOLOGICA Instruments). La prueba se efectuó a 25°C, después de que la muestra hubo alcanzado la temperatura establecida; es decir, después de un preacondicionamiento de 5 minutos, con una deformación constante del 1%, variando la frecuencia de 0,1 a 100 Hz, con una duración de 12 minutos.

40 Puede hallarse otra información útil para la medición de la viscosidad y de los módulos G' y G" en el estándar ISO 15798/2022 y en la página 10 de la publicación científica "Guidelines for standardization of bioprinting: a systematic study of process parameters and their effect on bioprinted structures", en el párrafo "Reología" ("Rheology" en inglés).

45 La Figura 5 muestra dos gráficos representativos de las propiedades reológicas de la composición (en negro) comparadas con la preparación estándar de colágeno nativo (en gris). En particular, el gráfico de la izquierda muestra la tendencia de la viscosidad en función de la tasa de deformación (a partir de lo cual puede verse el típico comportamiento de aclaramiento de cizalladura de los dos materiales); el de la derecha muestra la tendencia de los módulos G' y G" en función de la frecuencia. La Figura 6 muestra dos gráficos representativos de las propiedades reológicas de la composición (en negro) comparados con una preparación estándar de colágeno nativo (en gris). En particular, el gráfico de la derecha muestra la tendencia de los módulos G' y G" en función del esfuerzo de cizalladura; el de la izquierda muestra la tendencia de la tangente de pérdida.

El colágeno de la invención puede producirse por un proceso de múltiples etapas representadas esquemáticamente en la Figura 1 a partir de fibras crudas de colágeno de tipo I nativo.

55 Según otro de sus aspectos, el contenido de la invención es un proceso para la preparación del colágeno y de la composición de la invención, que comprende las siguientes etapas:

- moler las fibras crudas de colágeno equino de tipo I, dispersarlas en una disolución ácida, filtrar el gel en suspensión así obtenido y diluirlo hasta obtener una suspensión al 0,2-0,4% p/v;
 - homogeneizar la suspensión obtenida en la etapa (a) a 10.000-20.000 rpm durante un periodo de 1 a 5 minutos a una temperatura de 8-20°C, repitiendo luego un número de ciclos entre 5 y 20;
 - acidificar la suspensión obtenida en la etapa (b) hasta un pH de 2,3 a 2,8 a una temperatura de 10-25°C;
 - alcalinizar la suspensión obtenida en la etapa (c) hasta un pH de 8,8 a 9,4 a una temperatura de 8-20°C;
 - acilar el colágeno contenido en la suspensión obtenida en la etapa (d) mediante la adición de un anhídrido cíclico a una tasa de 10-100 mg/g de colágeno, a un pH de 8,8 a 9,2 a una temperatura de 8-20°C durante un periodo de 10 minutos a 4 horas;
 - precipitar el colágeno mediante la adición de una solución acuosa ácida y centrifugar a 8.000-9.000 rpm durante un periodo de 20 a 30 minutos a una temperatura de 8-20°C;
 - lavar el colágeno aislado por centrifugación en la etapa (f) suspendiéndolo en agua y centrifugando a 8.000-9.000 rpm durante un periodo de 20 a 30 minutos a una temperatura de 8-20°C de 4 a 10 veces;
 - liofilizar el colágeno aislado por centrifugación en la etapa (g);
 - dispersar el colágeno liofilizado obtenido en la etapa (h) en un disolvente a un pH de 7,0-7,6 hasta una concentración de 0,5 a 4,0 % p/v, a una temperatura de 10-25°C durante un periodo de 5 a 12 horas.
- Según una realización preferida, se muelen parcialmente (por homogeneización leve) fibras adecuadamente hidratadas de colágeno equino de tipo I para aumentar su superficie específica y la eficacia de las etapas subsiguientes de procesamiento, y luego se dispersan en concentraciones que oscilan entre 0,5 % (p/v) y 3,0 % (p/v) en solución ácida ($\text{pH}=3,5\pm 0,5$), durante un periodo apropiado a temperatura controlada, hasta obtener un gel viscoso homogéneo. Acto seguido, el gel es filtrado para eliminar posibles residuos de aglomerados de fibras que no estén completamente disueltas, y se ajusta el título hasta obtener una concentración de 0,2-2,0% (p/v). A continuación, después de una etapa de homogeneización adicional, se enfria la suspensión resultante y se acidifica el entorno de reacción, preferiblemente con un ácido fuerte - por ejemplo, un ácido inorgánico como el ácido clorhídrico -, y luego se la basifica rápidamente con una base fuerte; por ejemplo una base inorgánica, tal como un hidróxido de un metal alcalino - por ejemplo, con hidróxido de sodio -. Acto seguido se lleva a cabo la acilación de los grupos amino del colágeno, lo que se logra agregando un anhídrido cíclico a las fibras en un disolvente orgánico apropiado —por ejemplo acetona (0,01-0,10 g de anhídrido por g de colágeno) y manteniendo el pH en el intervalo de 8,5-9,5 durante un periodo apropiado a 8-20°C. A continuación, se recogen las fibras de colágeno por precipitación agregando un ácido inorgánico —por ejemplo, ácido clorhídrico, a un pH de 3,0-4,3— y la subsiguiente centrifugación. Por último, las fibras se lavan en agua purificada para eliminar los subproductos de reacción o los posibles residuos de materiales que no han reaccionado, se liofilizan y se suspenden nuevamente a la concentración deseada (0,5% - 4,0%, p/v) en un tampón farmacéuticamente aceptable; por ejemplo, en tampón fosfato salino (1×) o una solución fisiológica (cloruro sódico al 0,9% p/v). Finalmente, la suspensión es filtrada y puede ser sometida entonces a desaireación y trasferida a recipientes estériles apropiados.

La Tabla 1 muestra a continuación las condiciones de reacción en detalle, en términos de intervalos adecuados y realizaciones preferidas.

Tabla 1

Etapa	Operación	Parámetros	Intervalos de uso	Intervalos preferidos
1	Molienda	Velocidad Tiempo Temperatura	800-6000 rpm 2-15 min 10-25°C	3000 rpm 8 min 15°C
	Dispersión	Concentración col (p/v) pH de la solución ácida Temperatura Tiempo	0,5-3,0% 3,3-3,6 10-25°C 6-12 h	1,0% 3,5 15°C 8 h
2	Filtrado	Colador Concentración final Temperatura	Tamiz 35-100 0,2-2,0% 20-25°C	Tamiz 60 0,3% 25°C
	Dilución	-	-	-
3	Homogeneización	Velocidad Tiempo Temperatura Número de ciclos	10000-20000 rpm 1-5 min 8-20°C 5-20	10000 rpm 2 min 10°C 10

Etapa	Operación	Parámetros	Intervalos de uso	Intervalos preferidos
	Acidificación	pH Temperatura	2,3-2,8 10-25°C	2,5 10°C
	Alcalinización	pH Temperatura	8,8-9,4 8-20°C	9,0 10°C
4	Acilación	Concentración de anhídrido pH Temperatura Tiempo	10-100 mg/g col 8,5-9,5 8-20°C 10 min - 4h	42 mg/g col 9,0 10°C 30 min
5	Precipitación	pH Temperatura	3,9-4,3 10-25°C	4,2 10°C
	Centrifugación y lavado	Velocidad Tiempo Temperatura Número de repeticiones	8000-9000 rpm 20-30 min 8-20°C 4-10	8500 rpm 20 min 10°C 6
6	Liofilización	-	-	-
	Dispersión	pH Concentración (p/v) Temperatura Tiempo	7,0-7,6 0,1- 4,0% 10-25°C 5-12 h	7,4 2,5% 10°C 6h

- rpm: revoluciones por minuto; h: horas; min: minutos; col: colágeno

Gracias al protocolo especial de síntesis usado, la composición resultante, que consta exclusivamente de colágeno de tipo I en forma de fibras, se caracteriza por propiedades químico-físicas y reológicas (mostradas en las Figuras 3, 4 y 5) que la hacen particularmente adecuada para aplicaciones de bioimpresión.

Como se ha mencionado, la composición de la invención puede ser objeto de impresión tal cual (con o sin otros componentes, seleccionados, por ejemplo, de otros biomateriales, fármacos, factores de crecimiento y mezclas de los mismos) o ser procesada adicionalmente; es decir, sometida a tratamientos de estabilización estructural por medios físicos (por ejemplo, irradiación UV, calor) o químicos para aumentar la estabilidad del constructo impreso.

La fuente del colágeno, que es exclusivamente equino, tiene ventajas significativas, como alergenicidad y inmunogenicidad menores y muy bajo riesgo de transmisión por zoonosis. Además, los altos niveles de organización estructural de este tipo de colágeno (es decir, de tipo I, de tendones) le permiten no solo proporcionar un soporte físico apropiado a las células en la realización de sus funciones, sino también imitar estrechamente la arquitectura de la matriz extracelular y, por lo tanto, proporcionar estímulos mecánicos y bioquímicos similares a los fisiológicos.

Además, la composición de la invención ofrece la posibilidad de superar las importantes desventajas mostradas por las biotintas de colágeno conocidas, tales como, por ejemplo, los estrechos intervalos operativos de la viscosidad, la alta sensibilidad a la temperatura y al pH, y la necesidad de inducir la gelificación del material mediante el uso de tampones de neutralización. Por lo tanto, la composición de la invención permite operar a pH neutro y a temperatura corporal y sin la necesidad de tampones de neutralización o de reticulantes químicos. Por último, la composición de la invención es compatible con la mayoría de las tecnologías populares de bioimpresión y en particular, sin limitación, con todos los sistemas de impresión por extrusión.

El colágeno obtenido en cualquiera de las etapas (f) a (i) del proceso anteriormente descrito y en las Etapas 1 a 5 de la Tabla 1, posiblemente sometido a liofilización, es un contenido adicional de la invención.

El uso del colágeno de la invención en una composición de biotinta es un contenido adicional de la invención.

También es contenido de la invención un procedimiento de impresión tridimensional que comprende la impresión de una composición de la invención, preferiblemente, pero no únicamente, por extrusión de dicha composición.

El colágeno y la composición de la invención pueden usarse en terapia y cirugía; por ejemplo, en su uso en la impresión tridimensional de andamios para la ingeniería tisular y/o en aplicaciones de medicina regenerativa para la regeneración de tejidos duros y blandos, apósticos y modelos celulares tridimensionales para el estudio *in vitro* de procesos fisiológicos, patológicos y tumorales y similares.

Sección experimental

30 Ejemplo 1

Ejemplo 1a. Preparación del colágeno de la invención

Se muelen parcialmente por homogeneización leve fibras crudas de colágeno de tipo I nativo en estado húmedo a 3000 rpm, a una temperatura de 15°C durante 8 min. A continuación, se dispersan en una disolución acuosa de ácido acético 0,5 M al 1% (p/v) (pH 3,5) durante 6-8 horas a temperatura controlada (10-15°C) hasta obtener un gel

viscoso homogéneo. En este punto, el gel se filtra a través de un colador de tamiz 60 y el título se ajusta hasta obtener una suspensión al 0,3 porciento (p/v). Acto seguido, la suspensión (por ejemplo, 100 ml) es sometida a 10 ciclos de homogeneización a 10000 rpm durante 2 min, intercalados con pausas de 5 min, a temperatura controlada (10-15°C). A continuación, se lleva a cabo la acidificación del entorno de reacción a un pH de 2,5 con ácido clorhídrico, y luego se eleva rápidamente el pH hasta 9,0 con hidróxido de sodio (T=10°C). En este punto, se efectúa la acilación agregando 14 mg de anhídrido glutárico previamente disuelto en 1 ml de acetona (0,042 g de anhídrido por g de colágeno). En esta etapa, el pH de la reacción es monitorizado constantemente y mantenido constante e igual a aproximadamente 9,0 (8,8-9,2) mediante la adición de hidróxido de sodio en toda la duración de la acilación (30 minutos) a 10-15°C. A continuación, se recogen las fibras de colágeno por precipitación con ácido clorhídrico, a un pH de 4,2 y luego se juntan por centrifugación a 8500 rpm durante 20 minutos at 10°C, dando lugar al colágeno de la invención. Entonces las fibras se lavan en agua purificada (6 lavados realizados por resuspensión del sedimento (constituido por las fibras de colágeno) en agua purificada y centrifugación a 8500 rpm durante 20 minutos a 10°C) y se liofilizan, dando así el colágeno liofilizado de la invención.

Ejemplo 1b. Preparación de la composición de la invención

15 La composición de la invención se obtiene por dispersión (6 horas, 10°C) de las fibras liofilizadas en tampón fosfato salino (1×), o una solución fisiológica (cloruro sódico al 0,9%) o un medio de cultivo celular a la concentración deseada, preferiblemente 2,5% (p/v), seguido por filtrado con un colador de tamiz 100 y la desaireación y la posible fotoestabilización final.

REIVINDICACIONES

1. Una composición de biotinta que comprende colágeno equino de tipo I caracterizada porque
 - el pH de dicha composición está entre 7,0 y 7,6;
 - 5 – dicha composición es pseudoplástica; y
 - dicho colágeno equino de tipo I está en suspensión y tiene un peso molecular promedio en peso de las cadenas $\alpha_1(I)$ y $\alpha_2(I)$ que oscila entre 120 y 200 kDa.
- 10 2. La composición según la reivindicación 1 caracterizada porque dicho colágeno está en suspensión en un disolvente seleccionado entre un tampón farmacéuticamente aceptable, preferiblemente un tampón fosfato salino, y una solución fisiológica de cloruro sódico al 0,9% p/v.
- 15 3. La composición según la reivindicación 1 o 2 caracterizada porque dicho colágeno está presente en una composición a una concentración del 0,5 al 4% p/v.
- 15 4. La composición según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3 caracterizada porque también comprende al menos un agente biológico adicional, preferiblemente seleccionado entre fármacos, factores de crecimiento, proteínas, células y mezclas de los mismos.
- 20 5. La composición según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4 caracterizada porque la viscosidad η está entre 1 y 10000 Pa·s para una tasa de deformación igual a 0,1 Hz, y entre 0,01 y 100 Pa·s para una tasa de deformación igual a 100 Hz; preferiblemente la viscosidad η está entre 5 y 5000 Pa·s para una tasa de deformación igual a 0,1 Hz, y entre 0,1 y 10 Pa·s para una tasa de deformación igual a 100 Hz.
- 25 6. La composición según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4 caracterizada porque el módulo de almacenamiento G' está entre 1 y 10000 Pa para frecuencias iguales a 0,1 Hz, y entre 10 y 10000 Pa para frecuencias iguales a 10 Hz, y el módulo de pérdida G'' está entre 0,1 y 1000 Pa para frecuencias iguales a 0,1 Hz, y entre 1 y 1000 Pa para frecuencias iguales a 10 Hz; preferiblemente, el módulo de almacenamiento G' está entre 5 y 5000 Pa para frecuencias iguales a 0,1 Hz, y entre 50 y 5000 Pa para frecuencias iguales a 10 Hz, y el módulo de pérdida G'' está entre 0,5 y 500 Pa para frecuencias iguales a 0,1 Hz, y entre 5 y 500 Pa para frecuencias iguales a 10 Hz.
- 30 7. La composición según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4 caracterizada porque en dicha composición $G' > G''$ y la relación G''/G' está entre 0,1 y 0,3.
- 30 8. La composición según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4 caracterizada porque dicho colágeno equino de tipo I está en forma de fibras y presenta el típico patrón de bandas del colágeno nativo con un periodo de 67 nm.
- 35 9. La composición según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8 para ser usada en terapia y cirugía, preferiblemente para imprimir tridimensionalmente andamios para la ingeniería tisular y/o aplicaciones de medicina regenerativa para la regeneración de tejidos duros y blandos, apóitos y modelos celulares tridimensionales para el estudio *in vitro* de procesos fisiológicos, patológicos y tumorales.
- 40 10. Un proceso para la preparación de la composición de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8 que comprende las siguientes etapas de:
 - a. moler las fibras crudas de colágeno equino de tipo I, dispersarlas en una disolución ácida, filtrar el gel en suspensión así obtenido y diluirlo hasta obtener una suspensión al 0,2-0,4% p/v;
 - 40 b. homogeneizar la suspensión obtenida en la etapa (a) a 10.000-20.000 rpm durante un periodo de 1 a 5 minutos a una temperatura de 8-20°C, repitiendo luego un número de ciclos entre 5 y 20;
 - c. acidificar la suspensión obtenida en la etapa (b) hasta un pH de 2,3 a 2,8 a una temperatura de 10-25°C;
 - 45 d. alcalinizar la suspensión obtenida en la etapa (c) hasta un pH de 8,8 a 9,4 a una temperatura de 8-20°C;
 - e. acilar el colágeno contenido en la suspensión obtenida en la etapa (d) mediante la adición de un anhídrido cíclico a una tasa de 10-100 mg/g de colágeno, a un pH de 8,8 a 9,2 a una temperatura de 8-20°C durante un periodo de 10 minutos a 4 horas;
 - f. precipitar el colágeno mediante la adición de una solución acuosa ácida y centrifugar a 8.000-9.000 rpm durante un periodo de 20 a 30 minutos a una temperatura de 8-20°C;
- 50 g. lavar el colágeno aislado por centrifugación en la etapa (f) suspendiéndolo en agua y centrifugando a 8.000-9.000 rpm durante un periodo de 20 a 30 minutos a una temperatura de 8-20°C de 4 a 10 veces;

- h. liofilizar el colágeno aislado por centrifugación en la etapa (g);
 - i. dispersar el colágeno liofilizado obtenido en la etapa (h) en un disolvente a un pH de 7,0-7,6 hasta una concentración de 0,5 a 4,0 % p/v, a una temperatura de 10-25°C durante un periodo de 5 a 12 horas.
- 5 11. El proceso según la reivindicación 10 caracterizado porque el anhídrido cíclico de la etapa (e) se selecciona entre anhídrido succínico y anhídrido glutárico.
12. Una composición preparada por un proceso que comprende las siguientes etapas:
- a. moler las fibras crudas de colágeno equino de tipo I, dispersarlas en una disolución ácida, filtrar el gel en suspensión así obtenido y diluirlo hasta obtener una suspensión al 0,2-0,4% p/v;
 - 10 b. homogeneizar la suspensión obtenida en la etapa (a) a 10.000-20.000 rpm durante un periodo de 1 a 5 minutos a una temperatura de 8-20°C, repitiendo luego un número de ciclos entre 5 y 20;
 - c. acidificar la suspensión obtenida en la etapa (b) hasta un pH de 2,3 a 2,8 a una temperatura de 10-25°C;
 - 15 d. alcalinizar la suspensión obtenida en la etapa (c) hasta un pH de 8,8 a 9,4 a una temperatura de 8-20°C;
 - e. acilar el colágeno contenido en la suspensión obtenida en la etapa (d) mediante la adición de un anhídrido cíclico a una tasa de 10-100 mg/g de colágeno, a un pH de 8,8 a 9,2 a una temperatura de 8-20°C durante un periodo de 20 minutos a 4 horas;
 - f. precipitar el colágeno mediante la adición de una solución acuosa ácida y centrifugar a 8.000-9.000 rpm durante un periodo de 20 a 30 minutos a una temperatura de 8-20°C;
 - 25 g. opcionalmente, lavar el colágeno aislado por centrifugación en la etapa (f) suspendiéndolo en agua y centrifugando a 8.000-9.000 rpm durante un periodo de 20 a 30 minutos a una temperatura de 8-20°C de 4 a 10 veces;
 - h. opcionalmente, liofilizar el colágeno aislado por centrifugación en la etapa (g);
 - 30 i. opcionalmente, dispersar el colágeno liofilizado obtenido en la etapa (h) en un disolvente a un pH de 7,0-7,6 hasta una concentración de 0,5 a 4,0 % p/v, a una temperatura de 10-25°C durante un periodo de 5 a 12 horas;
- opcionalmente en donde el anhídrido cíclico de la etapa (e) se selecciona entre anhídrido succínico y anhídrido glutárico.
- 35 13. Un procedimiento de impresión tridimensional que comprende la impresión de una composición según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8.
14. El procedimiento según la reivindicación 13 caracterizado porque comprende la extrusión de dicha composición.

Figura 1

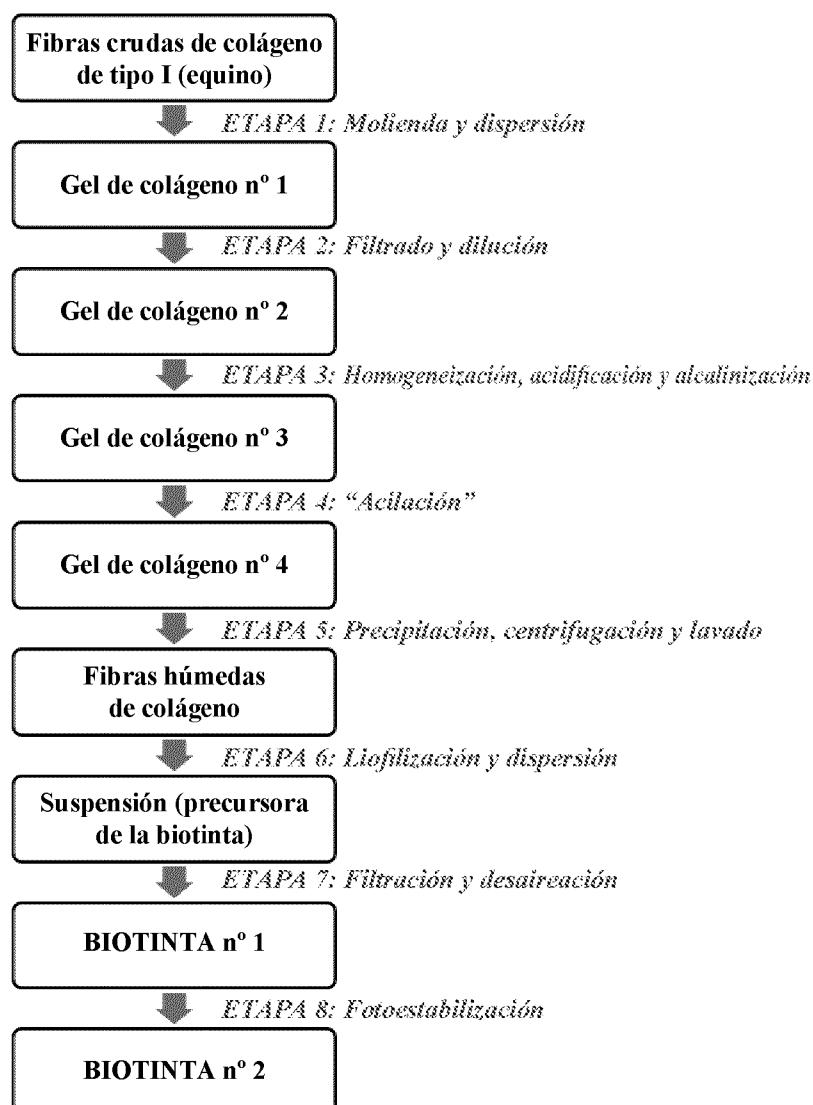


Figura 2

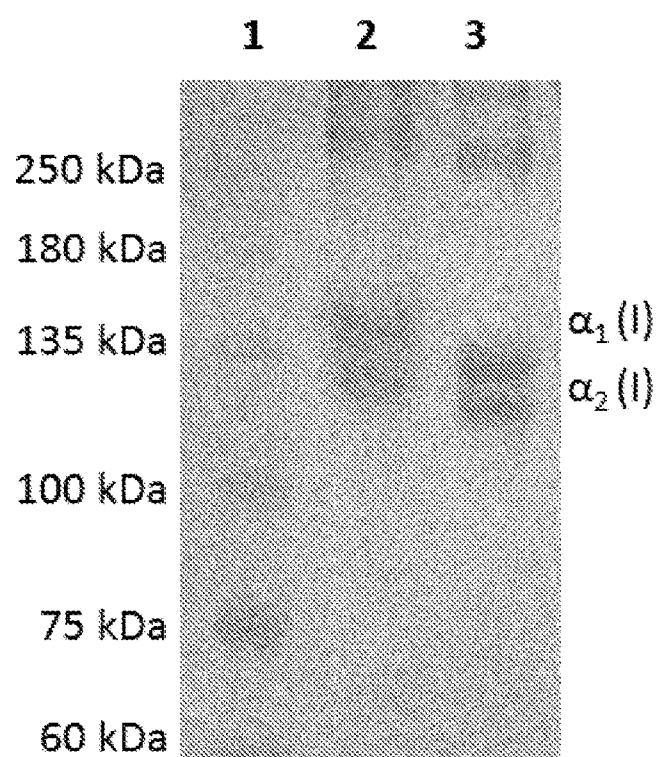


Figura 3

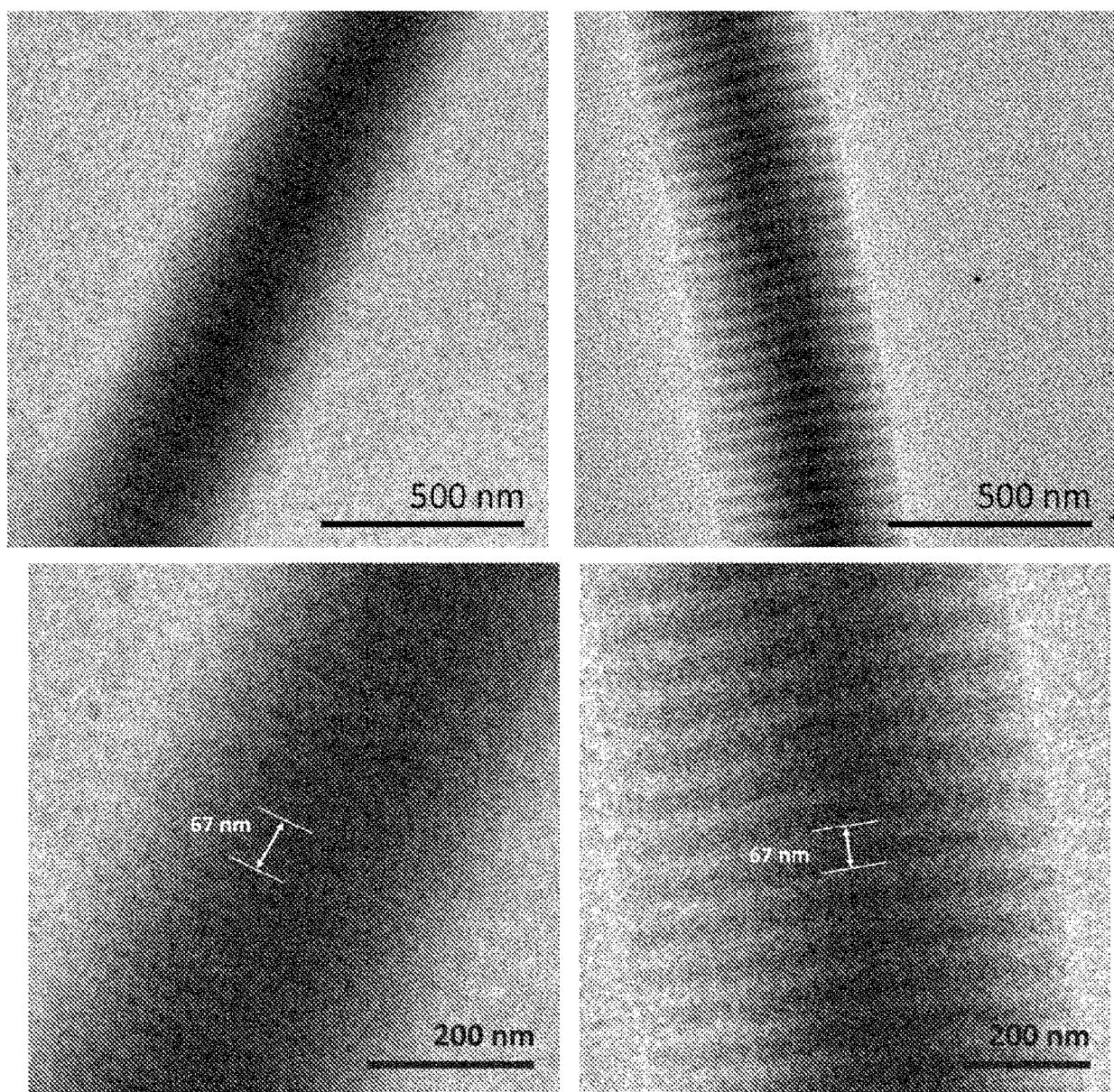
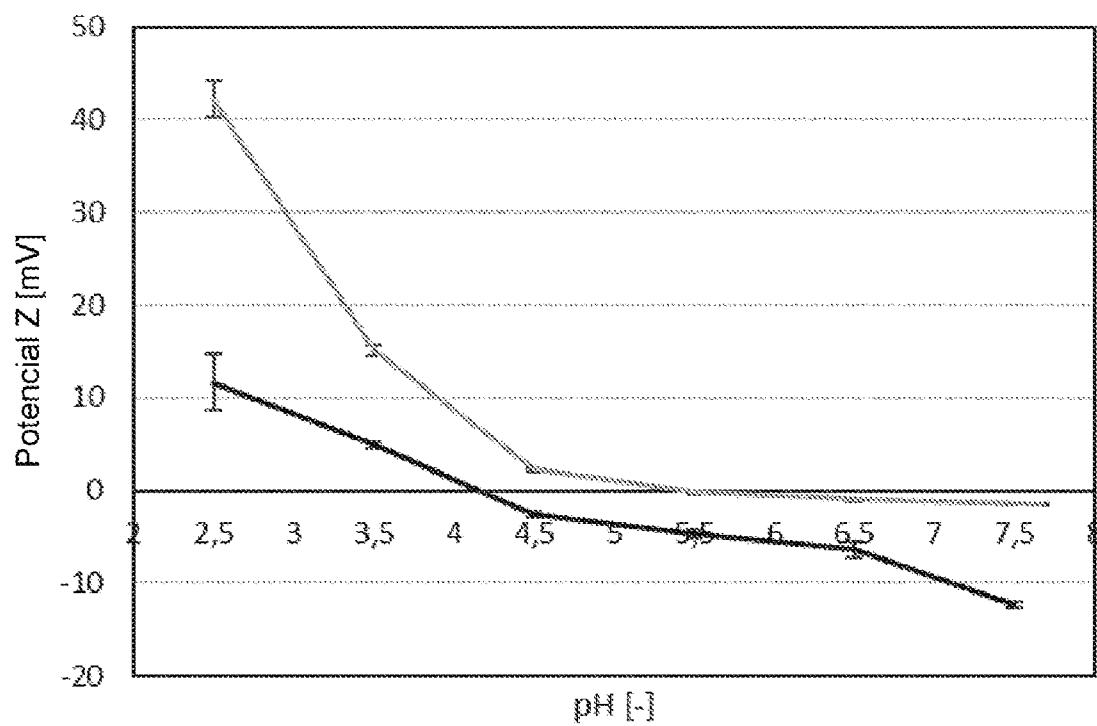


Figura 4



ES 2 994 770 T3

Figura 5

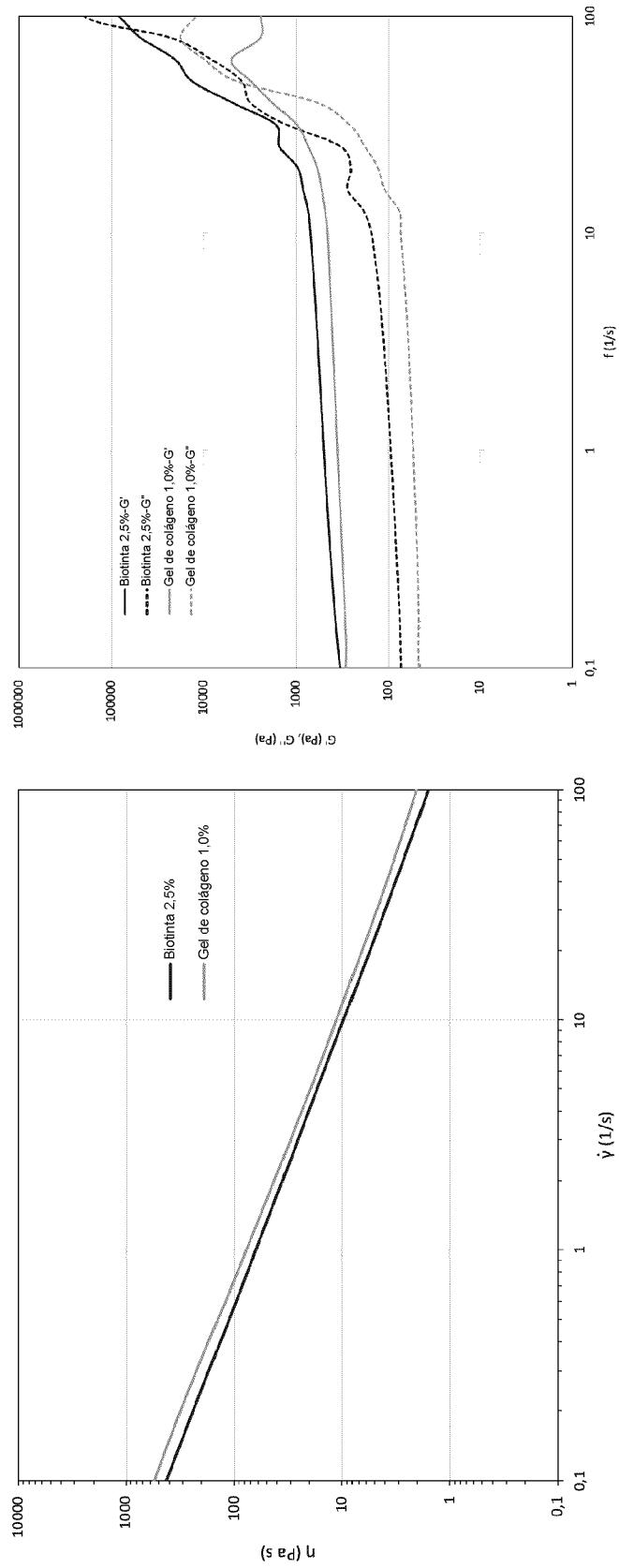


Figura 6

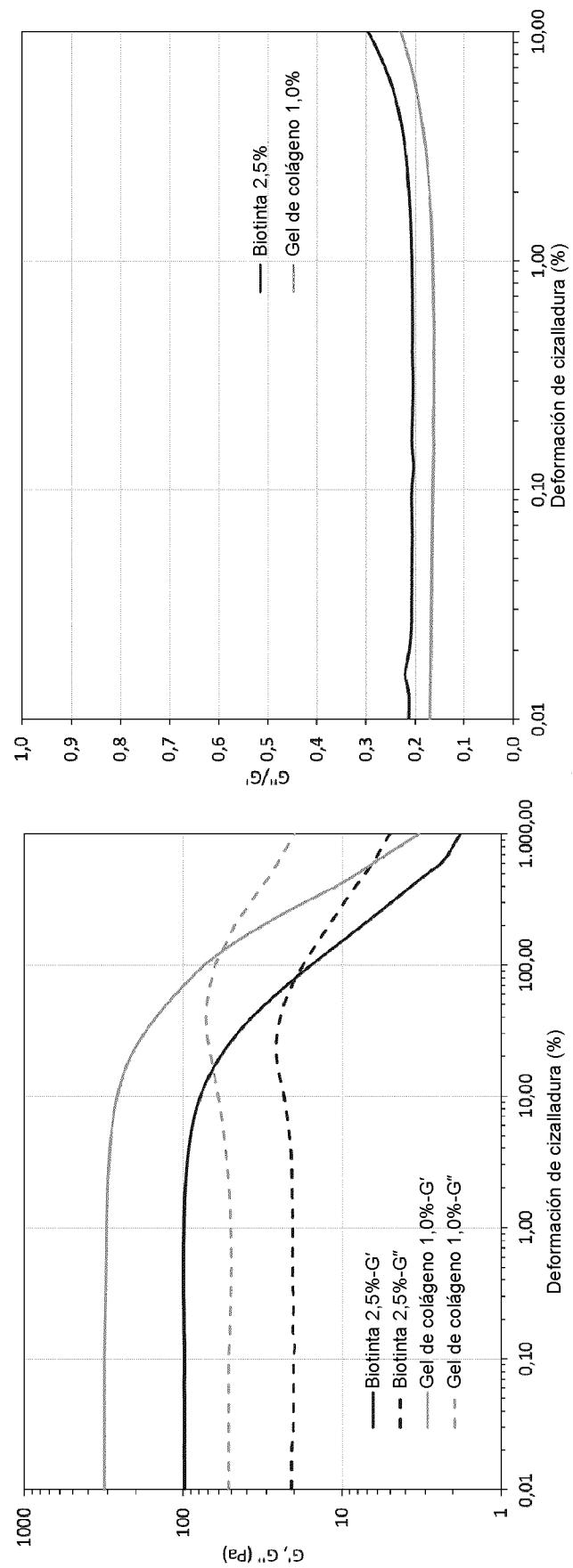


Figura 7

