

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **3 027 646**

51 Int. Cl.:

A61L 27/24 (2006.01)

A61L 27/54 (2006.01)

A61L 31/04 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **27.08.2015 PCT/US2015/047176**

87 Fecha y número de publicación internacional: **03.03.2016 WO16033322**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **27.08.2015 E 15835953 (9)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **02.04.2025 EP 3185922**

54 Título: **Sistemas de administración terapéutica a base de colágeno**

30 Prioridad:
27.08.2014 US 201462042664 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
16.06.2025

73 Titular/es:
**PURDUE RESEARCH FOUNDATION (100.00%)
101 Foundry Drive, Suite 2500
West Lafayette, IN 47906, US**

72 Inventor/es:
**VOYTIK-HARBIN, SHERRY y
JOSHI, RUCHA**

74 Agente/Representante:
SÁEZ MAESO, Ana

ES 3 027 646 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

Sistemas de administración terapéutica a base de colágeno

Referencia cruzada a solicitudes relacionadas

5 Esta solicitud reivindica la prioridad de Solicitud de Patente Provisional de EE. UU. No. de serie 62/042,664, presentada el 27 de agosto de 2014, titulado "Drug Delivery Sytem".

Campo técnico

10 La presente divulgación se refiere en general a un dispositivo de administración terapéutica que comprende una matriz de fibrillas de colágeno sintéticas con un agente activo disperso en ella, una solución de prematriz operable para fabricar un dispositivo de administración, no cubierto por las reivindicaciones, y métodos para la administración del agente activo, no cubiertos por las reivindicaciones. La divulgación también se refiere, pero no está cubierta por las reivindicaciones, a métodos de personalización de un sistema de administración mediante el control de una o más de las propiedades de biodegradabilidad proteolítica de la matriz de fibrillas de colágeno, las propiedades microestructurales de la matriz de fibrillas de colágeno, las propiedades mecánicas de la matriz de fibrillas de colágeno y las propiedades de transporte de la matriz de fibrillas de colágeno.

Antecedentes de la divulgación

20 El colágeno, el principal componente de la matriz extracelular (ECM) de los tejidos conectivos, ha recibido mucha atención como material candidato para su uso como vehículo de administración de fármacos implantable o inyectable, principalmente debido a su biocompatibilidad, baja inmunogenicidad y biodegradabilidad. Se sabe que las matrices extracelulares proporcionan andamiaje a las células, al tiempo que las organizan tridimensionalmente y proporcionan información esencial para regular el comportamiento celular. Como tal, el campo de la ingeniería de tejidos se esfuerza por imitar tanto la forma como la función de estos andamios para crear composiciones para la reparación y el reemplazo óptimos de tejidos. El colágeno, y en particular el colágeno tipo I, puede utilizarse en el campo de la ingeniería de tejidos debido a su alta disponibilidad en el organismo, su conservación entre tejidos y especies, su biodegradabilidad y su biocompatibilidad. De hecho, el colágeno no sólo es la molécula más abundante de la matriz extracelular (ECM), sino que también es responsable de la mayoría de las propiedades estructurales y mecánicas de varios tejidos. La forma *in vivo* del colágeno es una región central de triple hélice que está cubierta en ambos extremos por telopeptidos organizados aleatoriamente. Estas moléculas de colágeno se encuentran dentro de la matriz extracelular (ECM) ensambladas como redes ramificadas de fibrillas de colágeno que contienen entrecruzamientos moleculares naturales.

35 A pesar de las numerosas ventajas y la amplia investigación sobre el colágeno como biomaterial natural, su uso como vehículo para controlar la liberación de agentes activos locales ha sido limitado. Además, hasta la fecha no se ha logrado su aplicación como injerto de tejido que induce una regeneración tisular adecuada y al mismo tiempo consigue una administración localizada predecible de agentes específicos. De hecho, solo unas pocas formulaciones de administración de agentes activos a base de colágeno han llegado a los ensayos clínicos. Las formulaciones existentes se pueden clasificar como colágenos fibrilares no disociados o colágenos solubilizados. Estas formulaciones presentan una serie de deficiencias, entre las que se incluyen una composición molecular poco definida, una baja integridad mecánica, una biodegradación rápida y un control limitado sobre los perfiles de liberación del fármaco.

45 Los colágenos fibrilares no disociados son formulaciones que contienen partículas de matriz extracelular (ECM) de colágeno descelularizado, que se homogeneiza mecánicamente, se hincha con ácido y finalmente se liofiliza para formar una esponja que puede estar o no entrecruzada. Los colágenos solubles, por el contrario, se obtienen a partir de la pepsina o la solubilización ácida de tejidos de mamíferos para formar soluciones de colágeno viscosas, que luego se liofilizan y se formulan como una esponja entrecruzada o no entrecruzada o un gel viscoso inyectable. Como se mencionó anteriormente, las plataformas de administración de agentes activos a base de colágeno descritas anteriormente tienen muchas limitaciones, incluyendo composiciones moleculares mal definidas, baja integridad y estabilidad mecánica, rápida degradación proteolítica y un control de diseño limitado. Si bien el entrecruzamiento exógeno, incluyendo los medios químicos y físicos, se utiliza rutinariamente para mejorar las propiedades mecánicas y de manipulación, así como para aumentar la persistencia después de la implantación, dicho procesamiento está asociado con respuestas tisulares deletéreas y pérdida de actividad biológica.

55 El éxito marginal de estas formulaciones actuales de administración de fármacos a base de colágeno se puede atribuir a estas importantes limitaciones. Además, estas formulaciones convencionales exhiben microestructuras amorfas, con un control insatisfactorio de las propiedades del material, incluyendo el tamaño de poro y la degradabilidad proteolítica. El control superficial de estos parámetros se logra a menudo mediante la modulación de las condiciones de liofilización y/o el entrecruzamiento químico y físico exógeno. Los materiales formados sin reticulación representan geles viscosos. Se caracterizan por ser mecánicamente

inestables, demasiado blandos para manipularlos e incapaces de resistir las contracciones inducidas por las células, por lo que no logran soportar el crecimiento y la migración celular necesarios para la regeneración tisular. Por otra parte, se ha demostrado que el entrecruzamiento exógeno tiene efectos perjudiciales sobre las células y los tejidos, tal como la citotoxicidad o la calcificación tisular y la desnaturalización parcial del propio colágeno. El entrecruzamiento a base de aldehído puede generar residuos de aldehído en el producto final y puede influir en la biocompatibilidad del colágeno. Además, el entrecruzamiento deshidrotérmico tiene limitaciones naturales y no conduce a materiales con propiedades suficientemente mejoradas.

En consecuencia, es necesario realizar más avances en el diseño y desarrollo de sistemas de administración terapéutica local y regeneración tisular integrada. Como se explicará en detalle a continuación, la presente divulgación aborda esta necesidad y también proporciona composiciones, dispositivos y métodos asociados que abordan deficiencias en la técnica existente.

Resumen de la divulgación

Se proporciona un dispositivo de administración terapéutica que incluye una matriz de fibrillas de colágeno sintéticas insolubles y un agente activo disperso en toda la matriz de fibrillas de colágeno o dentro de una porción de la matriz de fibrillas de colágeno. La matriz de fibrillas de colágeno comprende un producto de polimerización de una mezcla de colágeno oligomérico soluble con uno o más tipos de moléculas de colágeno no oligomérico soluble; y un primer agente activo disperso por toda la matriz de fibrillas de colágeno o dentro de una porción de la matriz de fibrillas de colágeno; en donde la matriz de fibrillas de colágeno exhibe una rigidez de al menos 5 Pa; en donde el primer agente activo es un fármaco; y en donde la matriz no contiene células incrustadas. La mezcla de colágeno oligomérico soluble con uno o más tipos de moléculas de colágeno no oligomérico soluble es capaz de autoensamblarse en una matriz de fibrillas de colágeno macromolecular sintética en ausencia de un agente de entrecruzamiento exógeno.

En otro aspecto de la divulgación, no cubierto por las reivindicaciones, se proporciona un método para fabricar un dispositivo de administración terapéutica que incluye (i) formar una solución acuosa que comprende una cantidad de bloques de construcción de fibrillas de colágeno solubles; (ii) hacer que los bloques de construcción se polimericen por autoensamblaje, formando de este modo una matriz de fibrillas de colágeno sintéticas insolubles; y (iii) ya sea (a) incluir una cantidad de un agente activo en la solución acuosa con lo cual dicha causa forma una matriz de fibrillas de colágeno que tiene el agente activo disperso en ella o (b) poner en contacto la matriz de fibrillas de colágeno sintéticas con la cantidad de agente activo para formar una matriz de fibrillas de colágeno que tiene el agente activo disperso en ella. La cantidad de bloques de construcción comprende colágeno oligomérico soluble. En una realización, la matriz de fibrillas de colágeno exhibe una rigidez de al menos 5 Pa.

Esta divulgación también proporciona, pero no está cubierta por las reivindicaciones, una composición de prematriz que comprende una solución acuosa que incluye bloques de construcción de fibrillas de colágeno solubles y un agente activo. Los bloques de construcción de fibrillas de colágeno solubles incluyen colágeno oligomérico soluble o una mezcla de colágeno oligomérico soluble con uno o más tipos de moléculas de colágeno soluble no oligomérico, que pueden autoensamblarse en una matriz de fibrillas de colágeno macromolecular sintética en ausencia de un agente de entrecruzamiento exógeno. En una realización, las moléculas de colágeno soluble no oligoméricas incluyen una o más moléculas de telocolágeno soluble y moléculas de atelocolágeno soluble. En una realización, el agente está asociado con uno o más bloques de construcción de fibrillas de colágeno. En una realización, la matriz de fibrillas de colágeno exhibe una rigidez de al menos 5 Pa.

En otro aspecto de la divulgación, no cubierto por las reivindicaciones, se proporciona un método para administrar un agente activo que incluye el posicionamiento en una ubicación *in situ* (i) una composición de prematriz que comprende una solución acuosa que incluye bloques de construcción de fibrillas de colágeno solubles y un agente activo; o (ii) un dispositivo de administración terapéutica que incluye una matriz de fibrillas de colágeno sintética insoluble y un primer agente activo disperso en toda la matriz de fibrillas de colágeno o dentro de una porción de la matriz de fibrillas de colágeno.

Otras realizaciones y características de la solicitud se harán evidentes a partir de la siguiente descripción escrita junto con las figuras que la acompañan.

Breve descripción de las figuras

Los diversos aspectos de la presente solicitud se harán más evidentes y las enseñanzas de la presente solicitud en sí se entenderán mejor mediante referencia a la siguiente descripción de las realizaciones de la presente solicitud tomadas en conjunto con los dibujos adjuntos, en donde:

La FIG. 1 representa un esquema de ejemplos de bloques de construcción solubles de una matriz de fibrillas de colágeno de acuerdo con las enseñanzas de la presente divulgación;

- 5 La FIG. 2 representa una representación ilustrativa de la formación de un sistema de administración basado en una matriz de colágeno en un pocillo de una placa de 48 pocillos como se describe en el Ejemplo 1 de la presente divulgación, y en donde el dispositivo de administración, a su vez, se coloca en un depósito de solución salina tamponada con fosfato (PBS) en presencia o ausencia de colagenasa para medir experimentalmente su perfil de liberación del agente;
- La FIG. 3 representa una representación gráfica del efecto de FITC-Dextranos mezclados (2 mg/ml) sobre la cinética de polimerización de fibrillas de colágeno (A) y las propiedades físicas (B) del dispositivo de administración de matriz de fibrillas de colágeno como se describe en el Ejemplo 2 de la presente divulgación;
- 10 La FIG. 4 representa una representación ilustrativa de la cinética de liberación molecular dependiente del tamaño según lo previsto utilizando un modelo matemático basado en la difusión como se describe en el Ejemplo 3;
- La FIG. 5 representa datos obtenidos a partir del análisis de la liberación molecular de matrices de colágeno oligomérico polimerizable y colágeno monómero comercial (cola de rata BD) como se describe en el Ejemplo 4 de la presente divulgación;
- 15 La FIG. 6 representa datos obtenidos a partir del análisis de la liberación molecular de composiciones de fibrillas de colágeno oligomérico y matrices de fibrillas de colágeno monomérico comerciales en presencia de colagenasa como se describe en el Ejemplo 4 de la presente divulgación;
- 20 La FIG. 7 representa datos obtenidos a partir de un experimento de barrido de tiempo controlado por deformación y basado en cizallamiento oscilatorio con matrices de atelocolágeno (cuadrados), telocolágeno (círculos) u oligómero (triángulos) polimerizadas expuestas a 5000 U/ml de colagenasa como se describe en el Ejemplo 4 de la presente divulgación;
- La FIG. 8 representa datos obtenidos a partir del análisis de la liberación molecular de matrices de oligómero, telocolágeno y atelocolágeno (3 mg/ml) polimerizadas con moléculas de FITC-dextrano de 10 kDa o 2 MDa como se describe en el Ejemplo 4 de la presente divulgación;
- 25 La FIG. 9 representa datos del perfil de polimerización obtenidos durante la polimerización de matrices de fibrillas de colágeno como se describe en el Ejemplo 6 de la presente divulgación;
- La FIG. 10 representa perfiles de liberación temporal de moléculas de FITC-Dextrano pequeñas (10 kDa; paneles A y B) y grandes (2 MDa; paneles C y D) polimerizadas dentro de una variedad de matrices de fibrillas de colágeno como se describe en los Ejemplos 7 y 10 de la presente divulgación;
- 30 La FIG. 11 representa un resumen de los datos obtenidos a partir de la liberación de FITC-dextrano a partir de matrices de fibrillas de colágeno de baja densidad (3 mg/ml) y alta densidad (15.6 mg/ml) en presencia de 50 U/ml de colagenasa como se describe en el Ejemplo 10 de la presente divulgación;
- La FIG. 12 representa un esquema que compara el tamaño de la fluoresceína y los pesos moleculares indicados de FITC-dextrano en relación con una variedad de agentes activos potenciales de acuerdo con las enseñanzas de la presente divulgación;
- 35 La FIG. 13 muestra un gráfico publicado previamente que compara el tamaño de partícula de FITC-Dextrano (MW) con el radio hidrodinámico (nm);
- La FIG. 14 representa un esquema de un método para crear matrices de fibrillas de colágeno de alta densidad utilizando compresión confinada como se describe en el Ejemplo 9 de la presente divulgación;
- 40 La FIG. 15 representa datos de cinética de liberación obtenidos a partir de matrices de oligómeros de baja densidad (3 mg/ml) preparadas con FITC-Dextrano de 10 kDa (panel izquierdo) o 2 MDa (panel derecho) y tratadas con la concentración de colagenasa indicada como se describe en el Ejemplo 4 de la presente divulgación;
- 45 La FIG. 16 muestra gráficos ilustrativos que muestran las tasas iniciales de liberación y las curvas T50% calculadas a partir de las curvas cinéticas de liberación de la FIG. 15 para las diferentes concentraciones de colagenasa;
- La FIG. 17 representa gráficos ilustrativos que muestran un resumen de los datos obtenidos para la liberación de FITC-dextrano de 10 kDa a partir de matrices de fibrillas de colágeno oligomérico preparadas en un amplio rango de densidades (3 a 40 mg/ml) en ausencia de colagenasa como se describe en el Ejemplo 11 de la presente divulgación;
- 50 La FIG. 18 representa gráficos ilustrativos que muestran un resumen de los datos obtenidos para la liberación de FITC-dextrano de 10 kDa a partir de matrices de fibrillas de colágeno oligomérico preparadas en un amplio

rango de densidades (3 a 40 mg/ml) en presencia de colagenasa (10 U/ml) como se describe en el Ejemplo 11 de la presente divulgación; y

La FIG. 19 muestra gráficos ilustrativos que muestran un resumen de los datos obtenidos para la liberación de FITC-dextrano de 2MDa a partir de matrices de fibrillas de colágeno oligomérico preparadas en un amplio rango de densidades (3 a 40 mg/ml) en presencia de colagenasa (10 U/ml) como se describe en el Ejemplo 11 de la presente divulgación.

Descripción detallada

La presente invención y su alcance quedan definidos por las reivindicaciones adjuntas. La descripción más genérica de la invención se proporciona sólo con fines ilustrativos. Las realizaciones que no están comprendidas en estas reivindicaciones se ofrecen únicamente como referencia.

A menos que se defina lo contrario, todos los términos técnicos y científicos utilizados en el presente documento tienen el mismo significado que comúnmente entiende una persona con conocimientos ordinarios en la técnica a la que pertenece esta solicitud.

La presente divulgación está dirigida a un dispositivo de administración terapéutica a base de colágeno que comprende una matriz de fibrillas de colágeno sintéticas insolubles con un agente activo disperso en ella. En otro aspecto, no cubierto por las reivindicaciones, la divulgación se dirige a una composición prematriz. En otros aspectos adicionales, no cubiertos por las reivindicaciones, la divulgación proporciona métodos para fabricar y utilizar el dispositivo de administración terapéutica y la composición de prematriz. De acuerdo con ciertas realizaciones de la presente divulgación, se prepara un dispositivo de administración terapéutica ilustrativo mediante la polimerización de mezclas definidas de bloques de construcción de matriz de fibrillas de colágeno a partir de una solución acuosa. El dispositivo de administración terapéutica a base de colágeno puede ser implantable o inyectable. Los sistemas descritos permiten una amplia gama de perfiles de liberación molecular espaciotemporal personalizables para uno o más productos terapéuticos, denominados en el presente documento agentes activos, incluyendo la liberación ráfaga, sostenida y dirigida.

Tal como se utiliza en el presente documento, el término "matriz de fibrillas de colágeno" o "material de fibrillas de colágeno" se refiere a una composición de colágeno tipo I que incluye fibrillas de colágeno y que se ha formado en condiciones controladas a partir de bloques de construcción de colágeno solubilizados. En una realización, al menos 1 % del colágeno en la matriz de fibrillas de colágeno está compuesto de oligómeros. En otras realizaciones, al menos 2%, al menos 3%, al menos 4% o al menos 5% del colágeno en la matriz de fibrillas de colágeno está compuesto de oligómeros. El material de matriz de fibrillas de colágeno tiene una rigidez de al menos 5 Pa. En otras realizaciones, el material de matriz de fibrillas de colágeno tiene una rigidez de al menos 10 Pa, al menos 15 Pa, al menos 20 Pa o al menos 25 Pa.

Tal como se utiliza en el presente documento, el término "colágeno" se refiere a una familia de al menos 20 proteínas secretadas genéticamente diferentes que cumplen una función predominantemente estructural y poseen una configuración estructural triple helicoidal única de tres unidades polipeptídicas conocidas como cadenas alfa. Las tres cadenas alfa (dos cadenas $\alpha 1$ (I) y una cadena $\alpha 2$ (I)) se caracterizan por $(\text{Gly-XY})_n$ unidades repetidas donde las posiciones X e Y a menudo están ocupadas por prolina e hidroxiprolina, formando una molécula de colágeno de triple hélice de aproximadamente 300 nm de largo flanqueada en cada extremo por un extremo telopéptido no helicoidal. Estas moléculas de colágeno, también conocidas como monómeros, son los bloques de construcción fundamentales que se autoensamblan de manera jerárquica para formar redes específicas de tejido de microfibrillas, fibrillas, fibras y haces de fibras que luego se combinan para formar la ECM de los tejidos del cuerpo. La lisil oxidasa se une y cataliza la formación de entrecruzamientos entre agregados prefibrilares de moléculas de colágeno escalonadas (llamados monómeros) para crear dímeros o trímeros entrecruzados covalentemente (llamados oligómeros). Los diferentes precursores de oligómeros modulan el empaquetamiento y ensamblaje molecular progresivo que finalmente produce una arquitectura de fibrillas y una función de matriz específicas del tejido. Tanto las formulaciones de monómeros como de oligómeros poseen regiones telopeptídicas intactas y contienen aldehídos reactivos generados a partir de entrecruzamientos intermedios lábiles al ácido. El tratamiento enzimático proteolítico del colágeno elimina las regiones telopeptídicas terminales para producir formulaciones de atelocolágeno, mientras que la eliminación de los amino y carboxitelopéptidos da como resultado una disposición amorfa de las moléculas de colágeno y la pérdida del patrón de fibrillas en bandas en un producto reconstituido.

Tal como se utiliza en el presente documento, el término "oligómero" se refiere a una molécula en donde dos o más moléculas de tropocolágeno están unidas covalentemente entre sí a través de un entrecruzamiento intramolecular natural y que es soluble en un fluido acuoso.

Tal como se utiliza en el presente documento, el término "telocolágeno" (también denominado "tropocolágeno", "telómero", "monómero de colágeno" o "colágeno monomérico") se refiere a una molécula de colágeno individual en donde los extremos telopeptídicos no helicoidales carboxi y amino terminales están intactos, que

es capaz de autoensamblarse en una matriz fibrilar y que carece de entrecruzamientos covalentes intermoleculares.

5 Tal como se utiliza en el presente documento, el término "telopéptido" se refiere a dominios no triples helicoidales amino y carboxiterminales de cadenas de tropocolágeno que se sabe que son importantes para la fibrillogénesis, la polimerización y la formación de entrecruzamientos intermoleculares mediada por lisiloxidasa.

Tal como se utiliza en el presente documento, el término "atelocolágeno" se refiere a una molécula de triple hélice en donde las regiones telopeptídicas se han eliminado parcial o completamente del tropocolágeno. Estas preparaciones de atelocolágeno suelen ser el resultado de procedimientos de extracción de colágeno de los tejidos a base de enzimas (por ejemplo, a base de pepsina).

10 Tal como se utiliza en el presente documento, el término "péptidos miméticos de colágeno" se refiere a bloques de construcción de colágeno sintetizados químicamente que tienen secuencias de aminoácidos específicas que representan la porción triple helicoidal del colágeno, a menudo -(Pro-Hyp-Gly)-, forma una conformación de triple hélice que se asemeja a la que se encuentra en los colágenos naturales.

15 Tal como se utiliza en el presente documento, el término "matriz" se refiere a una malla suelta en donde la matriz no contiene células incrustadas. En el contexto del colágeno, la matriz se refiere a un material compuesto formado por una red de fibrillas de colágeno insolubles o una nanoestructura amorfa rodeada por una fase de fluido intersticial.

20 Se debe entender y apreciar aquí que los oligómeros comprenden pequeños agregados de moléculas de colágeno (por ejemplo, dímeros o trimeros), que retienen los entrecruzamientos intermoleculares covalentes específicos del tejido del colágeno, mientras que el telocolágeno (o monómeros) son moléculas de colágeno individuales que carecen de estos entrecruzamientos covalentes intermoleculares. El telocolágeno y los oligómeros poseen regiones telopeptídicas intactas y contienen aldehídos reactivos generados a partir de entrecruzamientos intermedios lábiles al ácido. Sobre la polimerización *in vivo* natural, el proceso a través del cual las fibrillas de colágeno se ensamblan para formar una red polimérica de fibrillas, estos aldehídos reactivos reforman espontáneamente entrecruzamientos covalentes intermedios como parte del proceso de formación de fibrillas. Las formulaciones de atelómero (o atelocolágeno) solubilizadas con pepsina (deficientes en telopéptidos) se crean cuando el colágeno se trata con enzimas proteolíticas que eliminan las regiones terminales de los telopéptidos. Dado que tanto los amino (N) como los carboxilo (C) telopéptidos desempeñan funciones importantes en el entrecruzamiento y la formación de fibrillas, su eliminación completa da como resultado una disposición amorfa de las moléculas de colágeno y una consiguiente pérdida del patrón de fibrillas en bandas en un producto reconstituido.

35 Los bloques de construcción de la matriz de colágeno, incluyendo oligómeros, telocolágeno y atelocolágeno, se pueden obtener de una amplia variedad de fuentes de colágeno crudo conocidas en la técnica que incluyen, entre otros, tejidos de mamíferos, tales como pieles y tendones de bovinos, porcinos y equinos, y tendones humanos. Alternativamente, los bloques de construcción pueden ser péptidos miméticos de colágeno o moléculas de colágeno solubles producidas mediante tecnología recombinante. Las matrices formadas a partir de estos bloques de construcción como se describe en la presente divulgación exhiben propiedades mecanobiológicas superiores en comparación con las formulaciones de colágeno disponibles comercialmente. Las matrices descritas en el presente documento también presentan propiedades diferentes a las del colágeno crudo o nativo. Los polímeros de colágeno tipo I en forma de oligómero son un bloque de construcción de la matriz de fibrillas de colágeno sintéticas insolubles que se describe en el presente documento. Como se describe además en el presente documento, la relación de moléculas de colágeno soluble oligómero a no oligomérico, tales como, por ejemplo, atelocolágeno y/o telocolágeno, se puede variar para modular diversas propiedades de la matriz de fibrillas de colágeno formada, lo que permite la personalización de un dispositivo de administración terapéutica a base de colágeno como se divulga en el presente documento dependiendo del propósito previsto, la ubicación y la colocación del dispositivo.

45 Como se indicó anteriormente, además de la matriz de fibrillas de colágeno, el dispositivo de administración terapéutica a base de colágeno también incluye un agente activo o, opcionalmente, más de un agente activo. El uno o más agentes activos incluidos en el dispositivo también pueden variar dependiendo del propósito previsto, la ubicación y la colocación del dispositivo. Tal como se utiliza en el presente documento, el término "agente activo" se refiere a un fármaco. Los "fármacos" incluyen, entre otros, "moléculas pequeñas", incluyendo, entre otros, quimioterapéuticos, inhibidores, estimuladores, proteasas, antibióticos, antivirales; "biomoléculas", "moléculas grandes" o una combinación de los mismos y en los que el fármaco se utiliza para tener un efecto beneficioso o negativo sobre la proteína, célula o tejido objetivo.

55 Tal como se utiliza en el presente documento, el término "cantidad inmunomoduladora" se refiere a una cantidad de un agente o factor particular suficiente para mostrar un efecto demostrable en el sistema inmunológico del sujeto. La inmunomodulación puede suprimir o mejorar el sistema inmunológico según lo desee el médico. La supresión del sistema inmunológico puede ser deseable cuando el sujeto es un receptor de un trasplante de órgano o para el tratamiento de enfermedades autoinmunes que incluyen, entre otras, lupus, artritis autoinmune

y diabetes autoinmune; los expertos en la técnica conocen diagnósticos adicionales en los que es deseable la supresión del sistema inmunológico. Como alternativa, la inmunomodulación puede mejorar el sistema inmunológico, por ejemplo, en el tratamiento del cáncer, infecciones graves o reparación de heridas; los expertos en la técnica conocen diagnósticos adicionales en los que es deseable la mejora del sistema inmunológico.

Tal como se utiliza en el presente documento, el término "cantidad oncostáticamente efectiva" es una cantidad de un agente que es capaz de inhibir el crecimiento de células tumorales en un sujeto que tiene células tumorales sensibles al agente seleccionado.

Tal como se utiliza en el presente documento, el término "cantidad moduladora hematopoyética" es aquella cantidad de un agente que mejora o inhibe la producción y/o maduración de las células sanguíneas.

Tal como se utiliza en el presente documento, el término "cantidad osteoinductora" es aquella cantidad de un agente que provoca o contribuye a un aumento medible en el crecimiento óseo o en la tasa de crecimiento óseo.

Los bloques de construcción de la matriz de fibrillas de colágeno utilizados para construir las composiciones de colágeno descritas en el presente documento se pueden obtener de diversas fuentes, entre las que se incluyen, por ejemplo, piel de porcino. Los tejidos adecuados útiles como material fuente que contiene colágeno para aislar colágeno o componentes de colágeno para elaborar las composiciones de colágeno descritas en el presente documento incluyen tejidos de submucosa o cualquier otro tejido que contenga matriz extracelular de un vertebrado de sangre caliente. Se describen métodos adecuados para preparar tejidos submucosos. Patentes de EE. UU. Nos. 4,902,508; 5,281,422 y 5,275,826. Se pueden utilizar tejidos que contienen material de matriz extracelular distintos del tejido submucoso para obtener colágeno de acuerdo con otras realizaciones divulgadas en el presente documento. Los expertos en la técnica conocen métodos para preparar tejidos derivados de otros materiales de la matriz extracelular para su uso en la obtención de colágeno purificado o componentes de la matriz extracelular parcialmente purificados. Por ejemplo, véase Patentes de EE. UU. Nos. 5,163,955 (tejido pericárdico); 5,554,389 (tejido submucoso de la vejiga urinaria); 6,099,567 (tejido submucoso del estómago); 6,576,265 (tejidos de la matriz extracelular en general); 6,793,939 (tejidos de la membrana basal del hígado); y 7,919,121 (tejidos de la membrana basal del hígado); e Publicación PCT Internacional No. WO 2001/45765 (tejidos de la matriz extracelular en general). En diversas otras realizaciones, el material de origen que contiene colágeno se puede seleccionar del grupo que consiste en tejido placentario, tejido ovárico, tejido uterino, tejido de cola de animal, tejido de piel, tejido óseo, tendón y tejido de cartílago. En algunas realizaciones, el colágeno se selecciona de colágeno de piel de cerdo, colágeno bovino y colágeno humano; sin embargo, debe entenderse y apreciarse en el presente documento que cualquier tejido adecuado que contenga matriz extracelular puede usarse como material fuente que contenga colágeno para aislar colágeno purificado o componentes de matriz extracelular parcialmente purificados de acuerdo con las presentes enseñanzas.

Se describe un método de preparación ilustrativo para preparar tejidos de submucosa como fuente de colágeno purificado o de componentes de matriz extracelular parcialmente purificados en Patente de EE.UU. No 4,902,508. En una realización, un segmento de intestino de vertebrado, por ejemplo, preferiblemente cosechado de especies porcinas, ovinas o bovinas, pero sin excluir otras especies, se somete a abrasión utilizando un movimiento de limpieza longitudinal para eliminar células o la eliminación de células se logra mediante lisis hipotónica o hipertónica. En una realización, el tejido submucoso se enjuaga en condiciones hipotónicas, tal como con agua o con solución salina en condiciones hipotónicas y, opcionalmente, se esteriliza. En otra realización ilustrativa, dichas composiciones se pueden preparar eliminando mecánicamente la porción luminal de la túnica mucosa y las capas musculares externas y/o lisando las células residentes con lavados hipotónicos o hipertónicos, tales como con agua o solución salina. En estas realizaciones, el tejido submucoso se puede almacenar en un estado hidratado o deshidratado antes del aislamiento del colágeno purificado o de los componentes de la matriz extracelular parcialmente purificados. En diversos aspectos, el tejido submucoso puede comprender cualquier realización de delaminación, incluyendo la túnica submucosa deslaminada tanto de la túnica muscular como de al menos la porción luminal de la túnica mucosa de un vertebrado de sangre caliente.

Como se indicó anteriormente, uno de los bloques de construcción utilizados para preparar la matriz de fibrillas de colágeno es el colágeno oligomérico. La presencia de colágeno oligomérico permite el autoensamblaje de los bloques de construcción en una matriz de fibrillas de colágeno y aumenta la tasa de ensamblaje, lo que produce composiciones de colágeno con microestructuras de fibrillas distintas y una excelente integridad mecánica (por ejemplo, rigidez).

Los bloques de construcción de la matriz de fibrillas de colágeno también incluyen diversas proporciones de moléculas de colágeno no oligomérico solubles. En una realización, los bloques de construcción incluyen uno o ambos de telocolágeno y/o atelocolágeno. En ciertas realizaciones, los bloques de construcción incluyen colágeno oligomérico y atelocolágeno. En otras realizaciones, los bloques de construcción incluyen colágeno oligomérico y telocolágeno. En otras realizaciones más, los bloques de construcción incluyen colágeno

oligomérico, telocolágeno y atelocolágeno. Las cantidades de colágeno oligomérico, telocolágeno, atelocolágeno y/u otras moléculas de colágeno soluble no oligomérico se pueden formular en solución antes del inicio de la polimerización para modular una o más propiedades de la matriz de fibrillas de colágeno sintética resultante, incluyendo, por ejemplo, rigidez, resistencia, transporte de fluidos y masa, degradación proteolítica y/o compatibilidad. Se reconoce que una relación predeterminada de moléculas de oligómero a colágeno no oligomérico soluble para su uso con un agente activo particular puede diferir de aquella adecuada para su uso con un agente activo diferente.

La concentración de colágeno puede expresarse en masa/volumen o masa/masa. El contenido de colágeno se puede medir por cualquier medio conocido en la técnica, incluyendo, entre otros, ensayos colorimétricos calibrados como el rojo Sirio y el análisis de aminoácidos para la hidroxiprolina. La viscosidad de las formulaciones de polímeros de colágeno se ve afectada por una serie de factores que pueden incluir, entre otros: solución o dispersión/suspensión, concentración, composición molecular, tamaño molecular, temperatura y condiciones de funcionamiento. Las mediciones de viscosidad pueden obtenerse por cualquier medio conocido en la técnica, incluyendo, entre otros, un viscosímetro o un reómetro.

La concentración de colágeno soluble presente en una composición de prematriz acuosa utilizada para fabricar una matriz de fibrillas de colágeno sintética puede variar. En algunas realizaciones, el colágeno está presente en una concentración de aproximadamente 0.5 mg/ml a aproximadamente 500 mg/ml. En otras realizaciones, el colágeno está presente en una concentración de aproximadamente 0.5 mg/ml a aproximadamente 400 mg/ml. En otras realizaciones, el colágeno está presente en una concentración de aproximadamente 0.5 mg/ml a aproximadamente 300 mg/ml. En algunas realizaciones, el colágeno está presente en una concentración de aproximadamente 0.5 mg/ml a aproximadamente 200 mg/ml. En otras realizaciones, el colágeno está presente en una concentración de aproximadamente 0.5 mg/ml a aproximadamente 100 mg/ml. En otras realizaciones, el colágeno está presente en una concentración de aproximadamente 1 mg/ml a aproximadamente 5 mg/ml. En otras realizaciones adicionales, el colágeno está presente en una concentración de aproximadamente 2 mg/ml a aproximadamente 5 mg/ml. En algunas realizaciones, el colágeno está presente en una concentración de aproximadamente 3.5 mg/ml. En otras realizaciones, el colágeno está presente en una concentración de aproximadamente 4 mg/ml a aproximadamente 10 mg/ml. En otras realizaciones, el colágeno está presente en una concentración de aproximadamente 5 mg/ml. En algunas realizaciones, el colágeno está presente en una concentración de aproximadamente 10 mg/ml a aproximadamente 20 mg/ml. En otras realizaciones, el colágeno está presente en una concentración de aproximadamente 12 mg/ml. En otras realizaciones, el colágeno está presente en una concentración de aproximadamente 20 mg/ml a aproximadamente 30 mg/ml. En algunas realizaciones, el colágeno está presente en una concentración de aproximadamente 24 mg/ml. En algunas realizaciones, el colágeno está presente en una concentración de aproximadamente 500 mg/ml. En otras realizaciones, el colágeno está presente en una concentración de aproximadamente 400 mg/ml. En otras realizaciones, el colágeno está presente en una concentración de aproximadamente 300 mg/ml. En otras realizaciones, el colágeno está presente en una concentración de aproximadamente 200 mg/ml. En otras realizaciones, el colágeno está presente en una concentración de aproximadamente 100 mg/ml. En otras realizaciones, el colágeno está presente en una concentración de aproximadamente 75 mg/ml. En otras realizaciones, el colágeno está presente en una concentración de aproximadamente 50 mg/ml.

En las realizaciones descritas en el presente documento, las matrices de fibrillas de colágeno sintéticas pueden tener un contenido de oligómero cuantificado por el peso molecular promedio del polímero (AMW). Como se describe en el presente documento, la modulación de AMW puede afectar la cinética de polimerización, la microestructura de las fibrillas, las propiedades moleculares y la arquitectura de las fibrillas de las matrices, por ejemplo, la ramificación entre fibrillas, el tamaño de los poros y la integridad mecánica (por ejemplo, la rigidez de la matriz). En otra realización, el contenido de oligómeros de la composición de prematriz, cuantificado por el peso molecular promedio del polímero, se correlaciona positivamente con la rigidez de la matriz.

En algunas realizaciones, un colágeno soluble no oligomérico incluido en la composición prematriz es colágeno reducido. Tal como se utiliza en el presente documento, "colágeno reducido" significa colágeno que se reduce in vitro para eliminar o reducir sustancialmente los aldehídos reactivos. Por ejemplo, el colágeno puede reducirse in vitro mediante el tratamiento del colágeno con un agente reductor (por ejemplo, borohidruro de sodio).

De acuerdo con ciertos aspectos de la presente divulgación, un dispositivo de administración terapéutica a base de colágeno comprende una matriz de fibrillas de colágeno sintéticas adaptada para la administración de un agente activo. La incorporación de un agente activo puede lograrse mediante varios métodos que incluyen, pero no necesariamente se limitan a, mezclar el agente con bloques de construcción de matriz de fibrillas de colágeno solubles en una composición de prematriz antes de la polimerización, exponer un material de fibrillas de colágeno sintético ya formado con un agente activo después de la polimerización y unir covalentemente un agente activo a un bloque de construcción de matriz de fibrillas de colágeno soluble y polimerizar el bloque de construcción de colágeno modificado, ya sea solo o en presencia de bloques de construcción de matriz de fibrillas de colágeno no modificados. Se debe entender y apreciar en el presente documento que el método de incorporación de un agente activo en la matriz de fibrillas de colágeno sintéticas puede variar basándose en el agente activo. Se reconoce además que el método de incorporación de un primer agente activo en la matriz de

fibrillas de colágeno puede ser el mismo o diferente del método de incorporación de un segundo agente activo en la matriz de fibrillas de colágeno. También debe entenderse y apreciarse en el presente documento que los términos "primero", "segundo" y "tercero" tal como se aplican a un agente activo, tienen por objeto permitir distinciones entre diferentes agentes activos y no necesariamente transmiten una característica o un orden cronológico requerido.

La pureza de una matriz de fibrillas de colágeno de acuerdo con las enseñanzas de la presente divulgación se puede evaluar por cualquier medio conocido en la técnica, incluyendo, pero no limitado a, SDS-PAGE ya sea en el polímero de colágeno directamente o después de una escisión enzimática específica (colagenasa bacteriana) o química (bromuro de cianógeno), mapeo de péptidos, secuenciación amino-terminal y ensayos de impurezas no colágenas. Los métodos para caracterizar las características de una matriz de fibrillas de colágeno incluyen, entre otros, HPLC de intercambio catiónico, fluorescencia natural, LC/MS, MS, dispersión de luz dinámica, cromatografía de exclusión por tamaño, mediciones de viscosidad, difracción circular, calorimetría diferencial de barrido, susceptibilidad a la tripsina, perfil de impurezas, TEM, SEM, crio-SEM, microscopía confocal, microscopía multifotónica y microscopía de fuerza atómica.

De acuerdo con ciertos aspectos expuestos en el presente documento, las características microestructurales cualitativas y cuantitativas de una matriz de fibrillas de colágeno se pueden determinar mediante microscopía electrónica de barrido ambiental o de criostato, microscopía electrónica de transmisión, microscopía confocal y microscopía multifotónica de generación de segundo armónico. Las propiedades de tracción, compresión y viscoelásticas se pueden determinar mediante reometría o ensayos de tracción. Todos estos métodos son conocidos en la técnica o se describen con más detalle en Solicitud de patente de EE. UU. Ser. No. 11/435,635 (publicada el 22 de noviembre de 2007), como Publicación No. 2007/0269476 A1), Solicitud de Patente de EE. UU. Ser. No. 11/914,606 (publicada el 8 de enero de 2009), como publicación No. 2009/0011021 A1), Solicitud de Patente de EE. UU. Ser. No. 12/300,951 (publicada el 9 de julio de 2009), como Publicación No. 2009/0175922 A1), Solicitud de Patente de EE. UU. Ser. No. 13/192,276 (publicada el 2 de febrero de 2012), como Publicación No. 2012/0027732 A1), Solicitud de Patente de EE. UU. Ser. No. 13/383,796 (publicada el 10 de mayo de 2012), como Publicación No. 2012/0115222 A1), o se describen en Roeder et al., J. Biomech. Eng., vol. 124, pp. 214-222 (2002), en Pizzo et al., J. Appl. Physiol., vol. 98, pp. 1-13 (2004), Fulzele et al., Eur. J. Pharm. Sci., vol. 20, pp. 53-61 (2003), Griffey et al., J. Biomed. Mater. Res., vol. 58, pp. 10-15 (2001), Hunt et al., Am. J. Surg., vol. 114, pp. 302-307 (1967), y Schilling et al., Surgery, vol. 46, pp. 702-710 (1959). Las características del colágeno y los métodos para caracterizarlas se analizan en ASTM International F3089-14, 2014 West Conshohocken PA.

La matriz de fibrillas de colágeno sintéticas presenta una rigidez de al menos 5 Pa. En otra realización, la matriz de fibrillas de colágeno sintéticas exhibe una rigidez de entre 5 Pa y 100 GPa. La rigidez también puede denominarse módulo elástico o lineal.

En algunas realizaciones, la matriz de fibrillas de colágeno comprende un copolímero, denominándose dicha matriz de fibrillas de colágeno en el presente documento matriz de "fibrillas de colágeno híbrida". En una realización, el copolímero comprende un producto de polimerización de una mezcla de uno o más tipos de bloques de construcción de colágeno soluble con una o más moléculas sintéticas o naturales no colágenas que consisten en fracciones químicas individuales, que pueden ser diferentes o iguales. Tal como se utiliza en el presente documento, el término "copolímero" se refiere a fracciones químicas individuales que se unen de un extremo a otro para formar una molécula lineal, así como a fracciones químicas individuales unidas entre sí en forma de una estructura ramificada (por ejemplo, una estructura "de múltiples brazos" o "en forma de estrella"). En realizaciones alternativas, el copolímero comprende un copolímero que se obtiene por copolimerización de dos especies monoméricas, obtenido a partir de tres especies monoméricas ("terpolímeros"), obtenido a partir de cuatro especies monoméricas ("cuaterpolímeros") u obtenido a partir de más de cuatro especies monoméricas. La presente divulgación contempla realizaciones de una matriz híbrida de fibrillas de colágeno que incluye bloques de construcción de colágeno asociados con moléculas no colágenas dentro de las fibrillas de la matriz (denominadas en el presente documento "fibrillas híbridas") y también realizaciones de una matriz híbrida de fibrillas de colágeno en donde las moléculas no colágenas se polimerizan por separado de las fibrillas de colágeno para producir fibrillas de colágeno separadas y polímeros no colágenas dentro de la matriz híbrida de fibrillas de colágeno. En otra realización, se forma una matriz híbrida de fibrillas de colágeno proporcionando un polímero o copolímero no colágeno polimerizado que define poros y espacios intersticiales, introduciendo un fluido acuoso que comprende bloques de construcción de la matriz de fibrillas de colágeno solubles en los espacios intersticiales y polimerizando los bloques de construcción para formar una matriz de fibrillas de colágeno dentro de los espacios intersticiales.

En otro aspecto, no cubierto por las reivindicaciones, la presente divulgación está dirigida a composiciones de prematriz que se formulan para una polimerización posterior para proporcionar matrices de fibrillas de colágeno sintéticas insolubles y/o dispositivos de administración terapéutica a base de colágeno. La polimerización de una composición de prematriz para formar una matriz de fibrillas de colágeno se puede lograr en condiciones controladas, en donde las condiciones controladas incluyen, pero no se limitan a, pH, concentración de fosfato, temperatura, composición del tampón, fuerza iónica y composición y concentración de los bloques de

construcción y otras moléculas opcionales presentes en una composición de prematriz dada, que puede incluir tanto moléculas de colágeno como moléculas no colágenas.

Tal como se utiliza en el presente documento, el término "composición prematriz" se refiere a un fluido acuoso que incluye bloques de construcción de la matriz de fibrillas de colágeno solubles, bloques de construcción que incluyen oligómeros y, opcionalmente, uno o más tipos de moléculas de colágeno soluble no oligoméricas, bloques de construcción que demuestran una capacidad para autoensamblarse o polimerizarse en estructuras de orden superior (ensamblajes macromoleculares) en ausencia de agentes de entrecruzamientos exógenos. En una realización, los bloques de construcción se seleccionan basándose en su composición molecular y su capacidad de formación de fibrillas. En una realización, las moléculas de colágeno soluble no oligomérico incluyen una o ambas moléculas de telocolágeno y moléculas de atelocolágeno.

De acuerdo con una realización ilustrativa de la presente divulgación, una composición de prematriz comprende una solución de polímero de colágeno que comprende diferentes tipos de bloques de construcción de polímero de colágeno, incluyendo, entre otros, oligómero, monómero/telocolágeno (también denominado telómero) y atelocolágeno (también denominado atelómero). Estos bloques de construcción, como se muestra en la FIG. 1, se diferencian basándose en su contenido de entrecruzamientos intermoleculares, composición y química de entrecruzamientos. Haciendo referencia a la FIG. 1, (A) representa un oligómero, (B) telocolágeno y (C) un atelocolágeno. Barras grises en la FIG. 1 representan entrecruzamientos covalentes estables y maduros.

En algunas realizaciones, los bloques de construcción se obtienen solubilizando el colágeno del tejido y purificando el colágeno soluble. Por ejemplo, los bloques de construcción se pueden preparar utilizando colágeno solubilizado en ácido y condiciones de polimerización definidas que se controlan para producir matrices de colágeno tridimensionales con un rango de cinética de ensamblaje controlada (por ejemplo, tiempo medio de polimerización), composiciones moleculares y propiedades mecánicas de microestructura de fibrillas, por ejemplo, como se describe en Solicitudes de Patente de EE. UU. Nos. 11/435,635 (publicada el 22 de noviembre de 2007), como Publicación de EE. UU. No. 2007/0269476 y 11/903,326 (concedida el 27 de diciembre de 2011), como Patente de EE. UU. No. 8,084,055. En una realización, el colágeno es colágeno Tipo I. En ciertos aspectos de la presente divulgación, los bloques de construcción de la matriz de fibrillas de colágeno se han eliminado de un tejido fuente. Opcionalmente, los bloques de construcción pueden solubilizarse a partir de la fuente de tejido, mientras que, en otras realizaciones, los bloques de construcción comprenden colágeno sintético. En otras realizaciones más, los bloques de construcción comprenden colágeno recombinante.

En cualquiera de las diversas realizaciones descritas en el presente documento, las composiciones de colágeno de la presente divulgación se pueden combinar, antes, durante o después de la polimerización, con nutrientes, incluyendo minerales, aminoácidos, azúcares, péptidos, proteínas, vitaminas (tal como ácido ascórbico) o glicoproteínas que facilitan el cultivo de células madre hematopoyéticas, tales como laminina y fibronectina, ácido hialurónico o factores de crecimiento tal como el factor de crecimiento derivado de plaquetas o el factor de crecimiento transformante beta, y glucocorticoides tal como la dexametasona. En otras realizaciones ilustrativas, se pueden agregar inhibidores de la fibrillogénesis, tales como glicerol, glucosa o compuestos polihidroxilados, antes o durante la polimerización. En otras realizaciones ilustrativas, se pueden añadir agentes de entrecruzamiento, tales como carbodiimidas, aldehídos, lisiloxidasas, ésteres de N-hidroxisuccinimida, imidoésteres, hidrazidas y maleimidas, y similares, antes, durante o después de la polimerización.

Se pueden utilizar diversas técnicas para controlar el perfil de liberación terapéutica (también denominado perfil de liberación molecular) de un sistema de administración terapéutica a base de colágeno descrito en el presente documento. En un aspecto de esta divulgación, la composición de prematriz se modula para lograr materiales de fibrillas de colágeno sintético con una amplia gama de microestructuras de fibrillas, propiedades mecánicas y degradabilidades proteolíticas ajustables o personalizables mediante la selección de diversas proporciones de bloques de construcción oligoméricos y no oligoméricos. La modulación de la composición de la matriz de fibra de colágeno sintética y las condiciones de la reacción de autoensamblaje permiten regular la microestructura de las fibrillas y la viscosidad del fluido intersticial asociado, las propiedades mecánicas y la degradación proteolítica. La especificidad del diseño de la matriz de fibrillas de colágeno sintéticas permite la selección de restricciones mecanofísicas y capacidad bioestructiva.

En ciertos aspectos de los dispositivos de administración terapéutica, la matriz de fibrillas de colágeno se puede ajustar de tal manera que la relación predeterminada de moléculas de colágeno soluble oligómero: no oligomérico favorezca la liberación ráfaga, la liberación sostenida o la liberación variable del agente activo. La liberación en ráfaga es una liberación rápida del agente activo en un período de tiempo corto que administra una cantidad en forma de bolo del agente al área objetivo. La liberación sostenida proporciona una liberación continua del agente activo a un ritmo constante durante un período de tiempo predeterminado. Se prevé que se pueda formular un sistema de administración terapéutica para proporcionar una liberación ráfaga de un agente activo en una fase temprana, media o tardía. Se reconoce además que pueden liberarse diferentes agentes activos o diferentes concentraciones de un agente activo en diferentes fases. También se reconoce que un primer agente activo puede liberarse en una liberación sostenida mientras que un segundo agente activo puede liberarse en una liberación ráfaga.

En ciertos aspectos, el dispositivo de administración terapéutica comprende más de una capa de matriz de fibrillas de colágeno sintéticas, cada una de las cuales se distingue por al menos una propiedad física o agente activo. Las capas pueden generarse, por ejemplo, de forma esférica, cilíndrica, plana u otra forma tridimensional en donde una capa de matriz de fibrillas de colágeno sintéticas está completamente o casi completamente rodeada por al menos una segunda capa de matriz de fibrillas de colágeno sintéticas, en donde la segunda capa de matriz de colágeno comprende al menos una propiedad física o agente activo diferente de la primera capa de matriz de fibrillas de colágeno. Además, las capas de la matriz de fibrillas de colágeno pueden diferir mediante la selección de una relación predeterminada de moléculas de colágeno soluble oligómero: no oligomérico, mediante la selección de diferentes agentes activos o mediante diferentes concentraciones del agente activo. En otra realización, el dispositivo de administración terapéutica comprende gradientes de una o más propiedades físicas, moléculas de colágeno soluble y agentes activos.

Además, después de la formación de una matriz de fibrillas de colágeno sintéticas por polimerización, la matriz se puede procesar aún más, por ejemplo, por compresión confinada o no confinada, para lograr materiales de mayor densidad con una consistencia similar a la del tejido, mejor manejo y mejores propiedades mecánicas. Se describen ejemplos de opciones de procesamiento de compresión en Solicitud Publicada en EE. UU. No. 2015/0105323.

De acuerdo con ciertos aspectos de la presente divulgación, una matriz de fibrillas de colágeno sintéticas puede comprimirse para formar un gradiente de al menos una propiedad física. Tal como se utiliza en el presente documento, el término "comprimido" puede referirse a una reducción de tamaño o un aumento de densidad cuando se aplica una fuerza a la matriz de fibrillas de colágeno. Por ejemplo, la compresión se puede lograr a través de diversos métodos de aplicación de fuerza, tales como, pero no limitados a, compresión confinada, compresión variable, compresión física, centrifugación, ultracentrifugación, evaporación o aspiración. Además, de acuerdo con ciertos aspectos ilustrativos presentados en el presente documento, debe entenderse y apreciarse que la compresión de la matriz de fibrillas de colágeno puede formar un gradiente de al menos una propiedad física en la composición. Tal como se utiliza en el presente documento, el término "propiedad física" puede referirse a cualquier propiedad de las composiciones de colágeno, incluyendo las propiedades estructurales, mecánicas, químicas y cinéticas.

De acuerdo con ciertas realizaciones, el gradiente es un gradiente inducido por compresión. Tal como se utiliza en el presente documento, la frase "gradiente inducido por compresión" se refiere a un gradiente en la matriz de fibrillas de colágeno que se proporciona como resultado de la compresión a la que está sometida la matriz de fibrillas de colágeno.

En algunas realizaciones, la compresión es una compresión física. Tal como se utiliza en el presente documento, la frase "compresión física" se refiere a la compresión de una matriz de fibrillas de colágeno mediante la aplicación de fuerza por medios físicos.

En otras realizaciones, la compresión es una compresión confinada. Tal como se utiliza en el presente documento, la frase "compresión confinada" se refiere al confinamiento de la matriz de fibrillas de colágeno a medida que sufre compresión.

En otras realizaciones, la compresión es una compresión variable. Tal como se utiliza en el presente documento, la frase "compresión variable" se refiere a la compresión de una matriz de fibrillas de colágeno mediante la aplicación de fuerza de manera no lineal.

En otras realizaciones más, la compresión es centrifugación. En algunas realizaciones, la compresión es ultracentrifugación. En otras realizaciones, la compresión es evaporación. En algunas realizaciones, la compresión es aspiración. En ciertas realizaciones, la aspiración es aspiración al vacío. En realizaciones selectas, la compresión no es una compresión plástica porque dicha compresión plástica puede ser un proceso extremo en el cual casi todo el fluido que se puede retirar de las composiciones de colágeno se excreta y puede reducir la viabilidad celular de los andamiajes y dañar la arquitectura de la matriz natural.

Para las realizaciones en las que la compresión es una compresión física, la compresión física se puede realizar en una cámara que comprende un molde ajustable y una platina. Normalmente, la matriz de fibrillas de colágeno se puede insertar en el molde y luego someterla a compresión.

Además, la compresión física puede variar dependiendo de la ubicación de la platina porosa dentro del molde. Por ejemplo, el molde puede ser ajustable de modo que el polietileno poroso se posicione como parte de la platina y/o a lo largo de las paredes o el fondo del molde de muestra. La ubicación del polietileno poroso puede definir el gradiente de material resultante en la matriz de fibrillas de colágeno. En algunas realizaciones, la compresión es una fuerza física desde al menos una dirección. En otras realizaciones, la compresión es una fuerza física desde dos o más direcciones. En otras realizaciones, la compresión es una fuerza física desde tres o más direcciones. En algunas realizaciones, la compresión es una fuerza física desde cuatro o más direcciones.

De acuerdo con ciertos aspectos de la presente divulgación, una matriz de fibrillas de colágeno sintética como se describe en el presente documento puede fabricarse en condiciones controladas para obtener propiedades físicas particulares. Por ejemplo, las matrices de fibrillas de colágeno pueden tener la densidad de fibrillas de colágeno deseada, el tamaño de poro (ramificación fibrilla-fibrilla), el módulo elástico, la deformación por tracción, la tensión de tracción, el módulo lineal, el módulo de compresión, el módulo de pérdida, la fracción de área de fibrillas, la fracción de volumen de fibrillas, la concentración de colágeno, la densidad de siembra de células, el módulo de almacenamiento de cizallamiento (G' o comportamiento elástico (similar a un sólido)) y el delta del ángulo de fase (δ o la medida del comportamiento similar al fluido (viscoso) al sólido (elástico); δ es igual a 0° para el sólido de Hooke y a 90° para el fluido newtoniano).

Tal como se utiliza en el presente documento, un "módulo" puede ser un módulo elástico o lineal (definido por la pendiente de la región lineal de la curva de tensión-deformación obtenida utilizando protocolos de pruebas mecánicas convencionales; es decir, rigidez), un módulo de compresión, un módulo de pérdida o un módulo de almacenamiento de cizallamiento (por ejemplo, un módulo de almacenamiento). Estos términos son bien conocidos por los expertos en la técnica. Tal como se utiliza en el presente documento, una "fracción de volumen de fibrillas" (es decir, densidad de fibrillas) se define como el porcentaje del área total ocupada por fibrillas en tres dimensiones.

Un dispositivo de administración terapéutica a base de colágeno tal como el descrito en el presente documento se puede formar para su posterior implantación en un paciente, tal como, por ejemplo, como material de injerto de tejido, o se puede formar *in situ* inyectando una composición prematriz en una ubicación *in situ* para su posterior polimerización para formar un material de administración terapéutica a base de colágeno *in situ*.

En algunas realizaciones, el dispositivo de administración terapéutica a base de colágeno es un injerto médico. Una consideración importante para los injertos médicos, en particular los injertos de tejido blando, es el diseño de un injerto que promueva la vascularización del injerto, y particularmente uno que permita la coimplantación y la infiltración celular, que apoye estructural y funcionalmente el crecimiento celular, y que sea capaz de integrarse completamente con el tejido fisiológicamente. Otras consideraciones importantes incluyen que el injerto no debe impedir el crecimiento del tejido en regeneración y que su degradación no debe dejar subproductos que puedan afectar negativamente a las células involucradas en la regeneración del tejido. Los sistemas de administración terapéutica a base de colágeno que se describen en el presente documento no solo permiten la coimplantación y la infiltración celular, sino que también apoyan estructural y funcionalmente el crecimiento celular y pueden integrarse completamente con el tejido fisiológicamente al proporcionar un marco poroso fuerte adecuado para la infiltración y el crecimiento celular, pero también permiten la administración de agentes activos que promueven la vascularización en el sitio del injerto para mejorar la vascularización después del implante. La matriz de fibrillas de colágeno se puede formar en cualquier forma bidimensional o tridimensional realizando polimerización en un molde que tenga la forma y el tamaño deseados y/o mediante procesamiento posterior a la polimerización.

En otras realizaciones, se puede utilizar el sistema de administración terapéutica a base de colágeno *in vitro*. Por ejemplo, el uso *in vitro* de los sistemas de administración terapéutica a base de colágeno de la presente divulgación se puede utilizar para fines de investigación tales como cultivo de tejido celular, descubrimiento de fármacos y pruebas de toxicidad química. En otras realizaciones, el sistema de administración terapéutica a base de colágeno se puede utilizar *in vitro* para generar construcciones complejas de tejidos y órganos, incluyendo la vascularización, para la restauración de órganos o tejidos dañados o disfuncionales.

De acuerdo con ciertos aspectos expuestos en el presente documento, las matrices de fibrillas de colágeno pueden incluir, entre otras, matrices de fibrillas de baja densidad y matrices de fibrillas de alta densidad. Una matriz de fibrillas de baja densidad puede tener una concentración de colágeno inferior a aproximadamente 10 mg/ml, 9 mg/ml, 8 mg/ml, 7 mg/ml, 6 mg/ml, 5 mg/ml, 4 mg/ml, 3 mg/ml, 2 mg/ml o 1 mg/ml. Una matriz de fibrillas de alta densidad puede tener una concentración de colágeno superior a 10 mg/ml, 20 mg/ml, 30 mg/ml y 40 mg/ml o superior. Las aplicaciones adecuadas para matrices de fibrillas de baja densidad pueden incluir, entre otras, cultivo de células 3D *in vitro*, administración terapéutica inyectable y administración terapéutica implantable. Las aplicaciones adecuadas para matrices de fibrillas de alta densidad o construcciones de tejidos pueden incluir, entre otras, implantes quirúrgicos, láminas, material fibrilar, válvulas de tejido, gradientes de tejido, cartílago articular y productos médicos diseñados con ingeniería de tejidos.

Se debe entender y apreciar en el presente documento que los sistemas ilustrativos de administración terapéutica a base de colágeno de la presente divulgación se pueden usar en medicina humana y veterinaria tanto en forma experimental como condiciones *in vivo*. Los usos previstos de los sistemas ilustrativos de administración terapéutica de acuerdo con las enseñanzas de la presente divulgación incluyen, pero no se limitan a, como agentes hemostáticos, tales como sustitutos o reemplazos de tejidos faltantes, como equivalentes de piel y como matrices para el aumento de tejidos. Las características físicas deseadas de la matriz de fibra de colágeno para su uso en diferentes aplicaciones pueden diferir según la aplicación y el agente activo.

- En los siguientes ejemplos se describen diversos ejemplos que demuestran la preparación y prueba de composiciones, procesos y métodos de la presente divulgación. Estos ejemplos son sólo ilustrativos y no pretenden limitar o excluir otras realizaciones de la presente divulgación. Además, debe entenderse y apreciarse en el presente documento que, para medir y comparar la cinética de liberación molecular de diversos
- 5 materiales de fibrillas de colágeno en presencia y ausencia de colagenasa, se diseñó un sistema modelo *in vitro* para medir la cinética de liberación de materiales de fibrillas de colágeno al someter el sistema de matriz de colágeno 3D polimerizado con moléculas de FITC-Dextrano mezcladas a colagenasa o PBS 1X. En particular, el sistema modelo *in vitro* implicó mezclar FITC-Dextranos de diversos tamaños que varían de 10
- 10 kDa a 2 MDa dentro de colágenos polimerizables y luego establecer un modelo computacional para predecir la cinética de liberación de moléculas de diversos tamaños basándose en coeficientes de difusión conocidos para matrices de oligómeros. Luego, el sistema modelo experimental diseñado se utilizó para definir y comparar la cinética de liberación molecular dependiente del tamaño de FITC-Dextranos dentro de matrices de baja densidad preparadas con oligómeros de colágeno estandarizados y colágeno monomérico comercial.
- Tal como se utiliza en el presente documento, el término "mamífero" se refiere a cualquier especie perteneciente a la clase Mammalia, incluyendo, entre otros, los humanos, las vacas, los cerdos, los perros, los caballos o los
- 15 gatos.
- Tal como se utiliza en el presente documento, el término "tejido de mamífero" se refiere a cualquier tejido, incluyendo, entre otros, piel, músculos, tendones o tejido conectivo fibroso que se encuentra en los mamíferos.
- Tal como se utiliza en el presente documento, el término "difusión" se refiere al movimiento térmico aleatorio de átomos, moléculas, grupos de átomos, etc. en gases, líquidos y algunos sólidos.
- 20 Tal como se utiliza en el presente documento, el término "fibrillogénesis" se refiere al proceso de ensamblaje de monómeros de tropocolágeno en fibrillas maduras y estructuras de red de fibrillas asociadas.
- Tal como se utiliza en el presente documento, el término "gel" se refiere a una estructura de red tridimensional que surge de interacciones de cadenas de polímeros intermoleculares.
- 25 Tal como se utiliza en el presente documento, el término "permeabilidad" se refiere a una medida de la capacidad de los materiales porosos para transmitir fluidos; la tasa de flujo de un líquido a través de un material poroso.
- Tal como se utiliza en el presente documento, el término "proteína/péptido de colágeno recombinante" se refiere a un colágeno o polipéptido similar al colágeno producido por métodos recombinantes, tales como, pero sin limitarse a ellos, mediante la expresión de una secuencia de nucleótidos que codifica la proteína o el péptido
- 30 en un microorganismo, insecto, planta o animal huésped. Estas composiciones a menudo comprenden tripletes Gly-X-Y donde Gly es el aminoácido glicina y X e Y pueden ser iguales o diferentes, a menudo son prolina o hidroxiprolina, pero pueden ser cualquier aminoácido conocido.
- Tal como se utiliza en el presente documento, el término "autoensamblaje" se refiere al proceso mediante el cual una macromolécula compleja (por ejemplo, colágeno) o un sistema supramolecular (por ejemplo, un virus) se ensambla espontáneamente a partir de sus componentes.
- 35 Tal como se utiliza en el presente documento, el término "solución" se refiere a un tipo de mezcla homogénea compuesta de una sola fase. En dicha mezcla, un "soluto" es una sustancia disuelta en otra sustancia, conocida como "disolvente".
- 40 Tal como se utiliza en el presente documento, el término "rigidez" es un término general que describe el grado en el cual un material resiste la deformación en respuesta a una fuerza aplicada; las medidas específicas de rigidez dependen del formato de carga del material (por ejemplo, tensión, compresión, cizallamiento, flexión).
- Tal como se utiliza en el presente documento, el término "degradación" se refiere a un cambio en la estructura o apariencia química, física o molecular (por ejemplo, la morfología general) del material; la degradación del
- 45 colágeno en condiciones fisiológicas implica una escisión específica del sitio dentro de la región central de triple hélice por enzimas proteolíticas conocidas como colagenasas. Las colagenasas son miembros de la familia más grande de proteasas conocidas como metaloproteasas de matriz.
- Tal como se utiliza en el presente documento, el término "solubilidad" se refiere a una medida del grado en que un material puede disolverse; en el contexto de los polímeros de colágeno, la solubilidad se refiere a moléculas
- 50 de colágeno (parciales, totales o múltiples) o péptidos en una solución; otras calificaciones de solubilidad pueden incluir "soluble en ácido" y "soluble en sal neutra", que describen composiciones que son solubles en ácidos diluidos y soluciones de sal neutra, respectivamente.

Ejemplo 1: Formulación de dispositivos de administración de fibrillas de colágeno

Los bloques de construcción de las fibrillas de colágeno solubles, que incluyen oligómero, telocolágeno y atelocolágeno (u oligómero, telómero y atelómero), se derivaron de la dermis de cerdos con peso comercial. Las formulaciones de oligómeros se prepararon utilizando un método de solubilización ácida que extrae preferentemente oligómeros, que representan agregados de moléculas de colágeno (por ejemplo, trímero) conectados covalentemente por un entrecruzamiento intermolecular natural. Las formulaciones de telómeros se prepararon utilizando solubilización ácida seguida de una técnica de precipitación de sal. Se utilizaron soluciones salinas para aislar selectivamente las moléculas de colágeno que no estaban entrecruzadas o que contenían entrecruzamientos lábiles al ácido inmaduros, en particular porque las formulaciones de telómeros y oligómeros contienen grupos aldehído reactivos en los extremos de los telopeptidos. Finalmente, se prepararon formulaciones de atelocolágeno mediante una técnica de digestión en donde la pepsina escinde enzimáticamente los extremos telopeptídicos de los extremos N y C de la molécula de colágeno. Estos bloques de construcción de fibrillas de colágeno solubles están estandarizados y su calidad está controlada basándose en su composición molecular y su capacidad de polimerización (formación de fibrillas de colágeno). Para comparar con el colágeno de calidad comercial, el colágeno tipo I solubilizado en ácido extraído de colas de rata se adquirió de BD Biosciences (Bedford, MA, conocido como colágeno de cola de rata BD, BD-RTC).

Para la preparación de dispositivos de administración de fibrillas de colágeno a partir de diversas soluciones de colágeno solubilizado en ácido, los colágenos se diluyeron aún más en HCl 0.01 N y se neutralizaron aún más con solución salina tamponada con fosfato (PBS, 10X, pH 7.4) e hidróxido de sodio 0.1 N (NaOH) para lograr un pH neutro (7.4) y una concentración final de colágeno de 3 mg/ml. Para formular matrices con moléculas mezcladas libremente en ellas, se cargó FITC-Dextrano de cuatro tamaños diferentes (es decir, 10, 40, 500 y 2 MDa) para imitar moléculas terapéuticas de diferentes tamaños. Aquí, los FITC-Dextranos (10 kDa, 40 kDa, 500 kDa o 2 MDa, de Invitrogen, Eugene, OR) se solubilizaron en PBS 10X para obtener la concentración final deseada dentro de matrices polimerizadas. FITC-Dextrano permite una cuantificación sencilla de la cinética de liberación basada en la detección del nivel de fluorescencia del sobrenadante sobre el sistema de matriz de colágeno. Todas las soluciones neutralizadas se polimerizaron en un volumen de 0.25 ml en una placa de 48 pocillos (Corning, EE. UU.), como se muestra en la FIG. 2. El sistema permitió una cinética de liberación molecular en 0.75 ml de tampón superior que era PBS 1X (pH 7.4) en ausencia o presencia de colagenasa (tipo IV, de Worthington Biochemical Corporation, EE. UU.).

Ejemplo 2: La mezcla de FITC-Dextrano no tiene efecto sobre la cinética de polimerización de las fibrillas de colágeno ni sobre las propiedades viscoelásticas de la matriz de fibrillas de colágeno.

Para confirmar que la adición de FITC-Dextrano no tuvo efecto sobre la cinética de polimerización de fibrillas de colágeno y las propiedades físicas del dispositivo de administración de fibrillas de colágeno, se neutralizaron matrices de oligómeros (3 mg/ml) en ausencia y presencia de FITC-Dextranos (10 KDa y 2 MDa, cada uno a una concentración final de 1.0 mg/ml) como se describe en el procedimiento anterior. Cada solución neutralizada se colocó en un reómetro AR2000 adaptado con una geometría de placa paralela de acero inoxidable de 40 mm de diámetro (TA Instruments, New Castle, DE) para la polimerización en contacto con la placa de acero. Los cambios dependientes del tiempo en las propiedades viscoelásticas (módulo de almacenamiento de cizallamiento (G'), módulo de pérdida de cizallamiento (G'') y tangente del delta de desplazamiento de fase (δ)) durante la polimerización se monitorizaron a través de cizallamiento oscilatorio, utilizando un procedimiento de barrido de tiempo. La temperatura de la placa del reómetro se mantuvo a 4 °C durante un período de 5 minutos para obtener la línea base del módulo de almacenamiento de soluciones de colágeno neutralizado con o sin FITC-Dextrano antes de la polimerización. Luego se aumentó la temperatura a 37 °C para inducir la polimerización de las matrices. Se compararon la cinética de polimerización y las propiedades viscoelásticas de matrices preparadas con o sin FITC-Dextrano. El tiempo medio de polimerización (T_{half}) se calculó junto con la tasa de polimerización, definida como la pendiente de la curva de polimerización para cada muestra. Cada formulación se probó por triplicado.

Los resultados indicaron que la mezcla de FITC-Dextranos a 1 mg/ml no afectó significativamente la cinética de polimerización de fibrillas de colágeno ni las propiedades viscoelásticas de la matriz de fibrillas de colágeno resultante ($p > 0.05$), como se muestra en la FIG. 3. En particular, la FIG. 3A muestra la cinética de polimerización medida mediante cambios dependientes del tiempo en G' , mientras que la FIG. 3B muestra valores G' finales asociados para matrices de oligómeros de 3 mg/ml preparadas en ausencia y presencia de FITC-Dextranos de 10 KDa y 2000 KDa (1 mg/ml).

Ejemplo 3: Predicción del tiempo necesario para la liberación basada en difusión de moléculas de FITC-Dextrano de diversos tamaños a partir de materiales de fibrillas de colágeno

Para predecir la cinética de liberación basada en la difusión de FITC-Dextranos de diversos tamaños a partir de matrices de fibrillas de colágeno, así como definir los tiempos de muestreo del reservorio, se adaptó un modelo matemático establecido para matrices monolíticas. El modelo matemático se basó en la segunda ley de difusión de Fick para una geometría de matriz de losa con una distribución inicial del fármaco homogénea dentro del sistema de matriz de colágeno y un "sumidero" de sobrenadante asociado.

Las ecuaciones utilizadas para el modelado predictivo de la liberación a corto y largo plazo fueron:

Corto plazo:

$$\frac{M_t}{M_\infty} = 4 \left(\frac{Dt}{\pi L^2} \right)^{\frac{1}{2}}$$

Largo tiempo:

$$\frac{M_t}{M_\infty} = 1 - \frac{8}{\pi^2} \exp\left(-\frac{\pi^2 Dt}{L^2}\right)$$

5 Aquí, M_t y M_∞ denotan las cantidades acumuladas de fármaco liberado en el tiempo t y en el tiempo infinito respectivamente; D es el coeficiente de difusión del fármaco dentro del sistema y L representa el espesor total de la matriz. Los valores de longitud de las matrices de fibrillas de colágeno fueron 2.61 mm según lo definido por nuestro sistema experimental. Los valores del coeficiente de difusión (D) utilizados para FITC-Dextranos de 10 KDa, 40 KDa, 500 KDa y 2 MDa fueron $1.09 \text{ E}-10$, $4.8 \text{ E}-11$, $2.52 \text{ E}-11$ y $1.76 \text{ E}-11 \text{ (m}^2\text{/seg)}$ basándose en valores publicados previamente para matrices de colágeno oligomérico de 3 mg/ml.

10 Los resultados obtenidos mostraron que las tasas de liberación disminuyeron mientras que el T50% de liberación (tiempo requerido para el 50% de liberación acumulada) aumentó a medida que aumentó el tamaño de FITC-dextrano, como se muestra en la FIG. 4. Se podría esperar una cinética de liberación dependiente del tamaño ya que el coeficiente de difusión (D) de FITC-Dextranos disminuye con el aumento del tamaño molecular.

Ejemplo 4: Comparación de la cinética de liberación molecular dependiente del tamaño para matrices de fibrillas de colágeno de oligómeros y monómeros comerciales de baja densidad (3 mg/ml) en presencia y ausencia de colagenasa

20 Para validar y demostrar aún más la utilidad del modelo experimental diseñado para definir la cinética de liberación molecular de matrices de fibrillas de colágeno, se mezclaron FITC-Dextranos de 10 KDa, 40 KDa, 500 KDa y 2 MDa en matrices de oligómeros y monómeros comerciales y se comparó su liberación a partir del sistema modelo experimental *in vitro* diseñado. Se prepararon matrices (250 μl cada una) en placas de 48 pocillos con un depósito de 750 μl de PBS (1X, pH 7.4) en la parte superior para inducir la liberación basándose en difusión. Para simular la cinética de liberación basada tanto en la difusión como en la degradación proteolítica de las matrices de colágeno, se realizó un subconjunto de experimentos en presencia de 125 U/ml de colagenasa de *Clostridium histolyticum* (Worthington Biochem Corporation, Estados Unidos). Se debe tener en cuenta que la elección del tampón de reserva realizada de acuerdo con el presente sistema permitió investigar 1) el efecto de la microestructura de colágeno sola sobre la liberación molecular, cuando se utilizó PBS 1X (ausencia de condición de colagenasa); y 2) el efecto de la microestructura de colágeno junto con su degradabilidad proteolítica sobre la liberación molecular, cuando se utilizó colagenasa 125 U/ml (presencia de condición de colagenasa).

35 En diversos puntos de tiempo, se eliminó el sobrenadante y se reemplazó con PBS fresco o colagenasa de acuerdo con el sistema. Luego se determinó el FITC-dextrano dentro del sobrenadante mediante espectrofluorimetría (Molecular Devices Spectramax M5) en longitudes de onda de excitación y emisión de 493 y 530 nm, respectivamente. Este proceso se repitió hasta que las unidades de fluorescencia relativa del sobrenadante de los pocillos coincidieron con la fluorescencia inicial (PBS más/menos colagenasa que no contiene FITC-Dextrano), lo que indica la finalización de la liberación de FITC-Dextrano. Todos los valores de fluorescencia se normalizaron a la intensidad de fluorescencia total máxima y se graficó el % de liberación acumulada versus el tiempo. Los efectos adicionales de los niveles de colagenasa sobre las curvas cinéticas de liberación de FITC-Dextrano de 10 KDa y 2 MDa se pueden ver en la representación gráfica de la FIG. 15. En particular, matrices de oligómeros polimerizados de baja densidad (3 mg/ml) que contenían FITC-dextrano de 10 KDa o 2 MDa se sometieron a diversos niveles de colagenasa y se midió la cinética de liberación. Además, la FIG. 16 muestra gráficos ilustrativos que muestran las tasas iniciales de liberación y las curvas T50% calculadas a partir de las curvas de cinética de liberación para las distintas concentraciones de colagenasa.

45 Haciendo referencia ahora a la FIG. 5, se observó una liberación molecular dependiente del tamaño con matrices de oligómeros polimerizables, pero no con matrices de cola de rata BD comerciales. Más particularmente, los FITC-Dextranos con tamaños moleculares de 10 kDa (\times), 40 kDa (\square), 500 kDa (Δ) y 2 MDa (\circ) se polimerizaron a 0.5 mg/ml dentro de matrices de oligómeros y monómeros comerciales (cola de rata BD) (3 mg/ml). Para las matrices de colágeno de oligómero (A) y monómero comercial (D), los perfiles de liberación dependientes del tiempo se monitorizaron espectrofluorométricamente y se cuantificaron la tasa de liberación inicial (media \pm SD; $n = 3$; B, E) y T50% (media \pm SD; $n = 3$; C, F). Para cada panel, las letras indican grupos experimentales estadísticamente diferentes según lo determinado por la prueba de rango de Tukey-Kramer ($p < 0.05$). Cuando se utilizó un tampón PBS 1X para investigar el efecto de la microestructura del colágeno en la liberación molecular, los resultados mostraron que las matrices de oligómeros mostraron perfiles de liberación

que dependían del tamaño de los FITC-Dextranos (FIG. 5A). Por el contrario, dicha liberación molecular dependiente del tamaño no se observó con matrices monoméricas comerciales preparadas a la misma concentración (FIG. 5D). La cuantificación de las tasas de liberación inicial del oligómero (B) mostró una
 5 tendencia de disminución de la tasa de liberación a medida que el tamaño de FITC-Dextrano se hizo más grande (10 KDa a 2 MDa) y una tendencia creciente para T50% (C). Estas tendencias fueron consistentes con las predichas por el modelo computacional. No se observaron tendencias dependientes del tamaño en las tasas de liberación o T50% para matrices monoméricas comerciales. Los resultados mostraron que la microestructura de las matrices de fibrillas de colágeno oligomérico proporcionó un mejor control de la cinética de liberación de FITC-Dextrano, en comparación con la de las matrices de monómero de colágeno de cola de rata BD
 10 comerciales.

Haciendo referencia a la FIG. 6, se encontró que las matrices de oligómeros en presencia de colagenasa mantenían tendencias de liberación sostenida y dependiente del tamaño, mientras que las matrices de monómeros comerciales (cola de rata BD) no lo hacían. En particular, los FITC-Dextranos con tamaños moleculares de 10 kDa (x), 40 kDa (□), 500 kDa (Δ) y 2 MDa (○) se polimerizaron a 0.5 mg/ml dentro de matrices
 15 de oligómeros y monómeros comerciales (3 mg/ml). Para las matrices de oligómero (A) y monómero comercial (D), los perfiles de liberación dependientes del tiempo se monitorizaron espectrofluorométricamente en presencia de colagenasa (125 U/ml) y se cuantificaron la tasa de liberación inicial (media ± SD; n = 3; B, E) y T50% (media ± SD; n = 3; C, F). Para cada panel, las letras indican grupos experimentales estadísticamente diferentes según lo determinado por la prueba de rango de Tukey-Kramer ($p < 0.05$). Cuando se utilizó
 20 colagenasa 125 U/ml para investigar el efecto de la degradabilidad proteolítica además de la microestructura del colágeno en la cinética de liberación de FITC-Dextrano, las matrices de oligómeros mantuvieron perfiles de liberación sostenida y dependientes del tamaño (FIG. 6A), mientras que las matrices de colágeno monomérico comerciales mostraron una liberación "ráfaga" más rápida para todos los tamaños moleculares probados durante un período de tiempo determinado (FIG. 6D). La cuantificación de las pendientes iniciales de los perfiles
 25 de liberación dio tasas de liberación significativamente más altas y un T50% significativamente menor para las matrices monoméricas comerciales en comparación con las matrices oligoméricas ($p < 0.05$), que indica la rápida degradabilidad proteolítica y la incapacidad de las matrices monoméricas comerciales para soportar la liberación molecular durante un período de tiempo prolongado.

Por lo tanto, los resultados indicaron la formación exitosa de un material de bioinjerto multifuncional que se probó experimentalmente para la liberación de moléculas de FITC-Dextrano de diversos tamaños *in vitro*. El modelo experimental diseñado permitió investigar el efecto de la microestructura de las fibrillas de colágeno
 30 únicamente, así como tanto la microestructura de las fibrillas de colágeno como la degradabilidad proteolítica en la liberación molecular.

Después de establecer la funcionalidad y robustez del sistema ilustrativo de matriz de fibrillas de colágeno para la administración de diferentes tamaños de moléculas de FITC-Dextrano, el sistema de bioinjerto de colágeno se puede modular para que sea ajustable para la liberación. Debe entenderse y apreciarse aquí que la liberación molecular puede verse afectada por dos parámetros clave, a saber, 1) la microestructura de las
 35 fibrillas de colágeno y 2) su degradabilidad proteolítica. Como tal, el objetivo era incorporar enfoques para modular estos dos parámetros para personalizar la cinética de liberación de los materiales de fibrillas de colágeno. Se creía que mediante el uso de diferentes capacidades de ramificación interfibrilar de los bloques constructores de colágeno y alterando la densidad de las fibrillas de colágeno, se puede ajustar la cinética de liberación molecular a nivel de ensamblaje suprafibrilar.

Se propuso caracterizar la liberación molecular de materiales de fibrillas de colágeno de baja densidad (3 mg/ml) y luego modular la liberación molecular de estos materiales de fibrillas de colágeno combinando dos
 45 tipos de bloques de construcción en matrices de fibrillas de colágeno. Posteriormente, se propuso aumentar la densidad de las fibrillas de colágeno para proporcionar la liberación molecular durante períodos de tiempo prolongados y caracterizar la liberación de estos materiales de alta densidad. Para modular aún más la liberación molecular de estos materiales de fibrillas de colágeno de alta densidad, se propuso combinar oligómero y telocolágeno; y bloques de oligómero y atelocolágeno en diferentes proporciones como un medio
 50 para modular la degradabilidad proteolítica.

En términos de caracterizar la liberación molecular de materiales de fibrillas de colágeno de baja densidad, debe entenderse y apreciarse en el presente documento que los precursores de colágeno, telocolágenos, oligómeros y atelocolágenos, difieren en su composición de entrecruzamientos intermoleculares. Se ha demostrado previamente que los precursores de colágeno proporcionan un control independiente de las
 55 propiedades mecánicas y de transporte de la matriz de colágeno. Como tal, se plantea la hipótesis de que las matrices formadas a partir de estos precursores exhibirían una cinética de liberación diferente basándose en su microestructura de fibrillas variable, así como una degradabilidad proteolítica variable, en una concentración adecuada. Para comprobar esto, primero se estudió la degradabilidad proteolítica de las matrices, seguido de la caracterización de la liberación molecular de ellas tanto en ausencia como en presencia de colagenasa.
 60 También se propuso confirmar el efecto de la microestructura y la degradabilidad proteolítica en el mecanismo de liberación de matrices ajustando una función Weibull a los datos de liberación molecular.

Para confirmar las diferencias en la degradabilidad proteolítica de las matrices de oligómeros frente a las de telocolágeno y atelocolágeno, se realizó un experimento en donde se polimerizaron 3 mg/ml de matrices de oligómeros, telocolágeno y atelocolágeno en una placa de reómetro a 4 °C durante 5 minutos para obtener una línea de base y luego se aumentó la temperatura a 37 °C para la polimerización. Después de 30 minutos de polimerización, las matrices formadas se expusieron a 5000 U/ml de colagenasa en un experimento de barrido de tiempo controlado por deformación y basado en cizallamiento oscilatorio y se rastreó la tangente del delta del ángulo de desplazamiento de fase con respecto al tiempo como se muestra en la FIG. 7. Se graficó la tangente absoluta delta en función del tiempo y en esta figura se muestran muestras representativas de cada tipo de matriz. Un aumento en el valor de tangente delta ≥ 1 indicó un cambio de fase de sólido a líquido, lo que indica una degradación proteolítica completa del material. Luego se graficó la primera derivada de tangente delta en función del tiempo para obtener un pico de inflexión, que se utilizó para calcular el tiempo de degradación total de las matrices, después de restar los primeros 30 minutos de tiempo de polimerización. El análisis de datos mostró que el tiempo de degradación requerido para las matrices fue significativamente diferente para las matrices de oligómero, telocolágeno y atelocolágeno ($p < 0.05$; $N = 3$). Las matrices se degradaron en el orden de atelocolágeno (138.0 min), seguido de telocolágeno (186.7 min), seguido de matrices de oligómero (219.5 min), lo que indica que las matrices de atelocolágeno y oligómero representaban los extremos del espectro de degradación proteolítica obtenido. Los resultados sugirieron que el uso de atelocolágeno, telocolágeno y oligómero como bloques de construcción de colágeno puede ofrecer una oportunidad para ajustar la cinética de liberación de las moléculas de fármacos contenidas debido a la diferente degradabilidad proteolítica y las diferentes propiedades de microestructura de las fibrillas.

Basándose en la microestructura de las fibrillas y las diferencias de degradación proteolítica entre diversos bloques constructores de colágeno, como se informó anteriormente, se planteó la hipótesis de que las matrices formadas a partir de diferentes precursores de colágeno entregarán moléculas con diferentes cinéticas de liberación. Para probar esta hipótesis, se formularon matrices polimerizadas de 3 mg/ml a partir de bloques constructores de oligómero, telocolágeno y atelocolágeno, que contenían 10 kDa y 2 MDa de FITC-Dextrano, a una concentración final de 0.25 mg/ml. La formulación se realizó de acuerdo con el procedimiento descrito anteriormente con respecto a la formulación de dispositivos de administración de fibrillas de colágeno (Ejemplo 1). Luego se midió la cinética de liberación de los sistemas de administración formulados en dos condiciones: 1) en ausencia de colagenasa, para investigar el efecto de la microestructura en la cinética de liberación (sólo difusión); y 2) en presencia de 125 U/ml de colagenasa, para investigar el efecto de la microestructura y la degradabilidad proteolítica en la cinética de liberación (difusión + degradación).

Haciendo referencia ahora a la FIG. 8, se muestra una representación gráfica que ilustra que los perfiles de liberación molecular dependen de los bloques de construcción del polímero de colágeno. En particular, los FITC-Dextranos con tamaños moleculares de 10 kDa y 2 MDa se polimerizaron dentro de matrices de oligómero, telocolágeno y atelocolágeno (3 mg/ml). Los perfiles de liberación dependientes del tiempo se monitorizaron espectrofluorométricamente en ausencia (A, B) y presencia (C, D) de colagenasa (125 U/ml) y se cuantificaron la tasa de liberación inicial (media \pm SD; $n = 3$; A, C) y T50% (media \pm SD; $n = 3$; B, D). Para cada panel, las letras indican grupos experimentales estadísticamente diferentes según lo determinado por la prueba de rango de Tukey-Kramer. Los resultados mostraron que, en ausencia de colagenasa, las diferencias basadas en la microestructura del oligómero, telocolágeno y atelocolágeno afectaron los parámetros cinéticos de liberación (FIGS. 8A y 8B). Estaba claro que el atelocolágeno y el oligómero eran los bloques de construcción que formaban los extremos del espectro de liberación obtenido nuevamente.

En presencia de colagenasa, la tasa de liberación se mejoró debido a la degradabilidad proteolítica además de la difusión basada en la microestructura del colágeno, contribuyendo ambas a la liberación molecular. Curiosamente, la degradación proteolítica medida en presencia de colagenasa enfatizó las diferencias en las matrices de telocolágeno y oligómero, además de aquellas entre las matrices de oligómero y atelocolágeno. Como se ve en las FIGS. 8C y 8D, se obtuvo un aumento progresivo en la tasa de liberación inicial y una disminución progresiva en los valores de T50% ($p < 0.05$) para las matrices de oligómero, telocolágeno y atelocolágeno en presencia de colagenasa.

Este experimento demostró que las matrices de fibrillas de colágeno compuestas de diferentes bloques de construcción demostraron diferentes perfiles de liberación molecular, debido a la diferente microestructura de las fibrillas y la diferente degradación proteolítica de las matrices.

Ejemplo 5: Descifrando el efecto de diferentes bloques constructores de colágeno sobre el mecanismo de liberación de moléculas mediante la función Weibull

Hay varios modelos empíricos disponibles para simular la liberación de fármacos desde matrices poliméricas. Aunque el modelo de ley de potencia se ha utilizado ampliamente, está limitado a la descripción del primer 60% de la curva de liberación. Se ha observado que la calidad del ajuste es deficiente en puntos de tiempo más largos donde la liberación acumulada supera el ~60%. La función de Weibull es otra alternativa que se puede utilizar para la descripción de perfiles de liberación basándose en el uso empírico de la función de Weibull descrita por la ecuación:

$$\frac{M_t}{M_\infty} = 1 - \exp(-at^b).$$

5 M_t es la masa de fármaco liberada en el tiempo t , M_∞ es la masa del fármaco liberado en un tiempo infinito (se supone que es igual a la cantidad de fármaco añadido), a denota un parámetro de escala que depende del tiempo, mientras que b describe la forma de la progresión de la curva de disolución. Papadopoulou et al. proporcionaron un vínculo poderoso entre el parámetro de forma b y los mecanismos de difusión de la liberación, como se muestra en la Tabla 1 a continuación (ver, Papadopoulou V, Kosmidis K, Vlachou M, Macheras P: On the use of the Weibull function for the discernment of drug release mechanisms. *International journal of pharmaceutics* (2006) 309(1-2):44-50).

Tabla 1: Exponente b de la función de Weibull y mecanismo de liberación	
b	Observaciones sobre el mecanismo de liberación
$b < 0.35$	No se encuentra en la simulación ni en los resultados experimentales. Puede ocurrir en espacios altamente desordenados muy diferentes al grupo de percolación.
$b \sim 0.35-0.39$	Difusión en sustrato fractal morfológicamente similar al grupo de percolación
$0.39 < b < 0.69$	Difusión en sustrato fractal o desordenado diferente del grupo de percolación
$b \sim 0.69-0.75$	Difusión en el espacio euclidiano normal
$0.75 < b < 1$	Difusión en sustrato euclidiano normal con contribución de otro mecanismo de liberación
$b = 1$	Liberación de primer orden que obedece la primera ley de difusión de Fick; la constante de velocidad a controla la cinética de liberación y la relación adimensional solubilidad/dosis determina la fracción final de dosis disuelta.
$b > 1$	Curva sigmoidea indicativa de un mecanismo de liberación complejo

10 Se planteó la hipótesis de que, al ajustar la función de Weibull a las curvas de liberación obtenidas experimentalmente con diferentes bloques de construcción de fibrillas de colágeno solubles, se podrían descifrar los mecanismos de liberación subyacentes. Además, mediante el uso de la simulación basada en la función Weibull de la cinética de liberación en ausencia de la condición de colagenasa, se debería validar cómo las diferencias basadas en la microestructura por sí solas, causadas por la diferente capacidad de ramificación interfibrilar de los bloques constructores de colágeno, afectan su cinética de liberación molecular.

15

Para este fin, se incorporó la función Weibull a la cinética de liberación experimental obtenida a partir de colágeno monomérico comercial (cola de rata BD), atelocolágeno, telocolágeno y matrices de oligómeros mezclados con diversas moléculas de FITC-Dextrano. La función Weibull se ajustó bien a los datos experimentales y los valores de los parámetros a y b junto con R^2 y los intervalos de confianza determinados para los parámetros a y b de los ajustes se muestran en la Tabla 2 a continuación.

20

Los resultados muestran que las matrices de monómeros comerciales (cola de rata BD) dieron un mecanismo de liberación basado en difusión, mientras que las matrices de fibrillas de colágeno de oligómeros y telocolágeno mostraron un mecanismo de liberación combinado (difusión Fickiana y transporte de Caso II) asociado con ellas. El atelocolágeno mostró un valor completamente diferente del parámetro b , lo que quizás indica un mecanismo de liberación por difusión como en espacios altamente desordenados. Por lo tanto, dado que la función de Weibull era adecuada para liberar la cinética en ausencia de colagenasa sola, los resultados confirmaron que la microestructura de las fibrillas de colágeno afecta la liberación molecular.

25

Tabla 2: Parámetros a y b basados en la función Weibull para la cinética de liberación de matrices de colágeno formuladas a partir de diferentes bloques de construcción (N = 3 para cada matriz)

Rata BD	a	b	R cuadrado	CI (a;b)
2MDa	0.028348	0.533256	0.918419	[0.0089,0.4517;0.04784,0.6148]

ES 3 027 646 T3

500 kDa	0.021974	0.533584	0.932005	[0.0107,0.4728;0.0332,0.5943]
40 kDa	0.014174	0.608231	0.944953	[0.0064,0.5438;0.0219,0.6727]
10 kDa	0.017661	0.585925	0.951242	[0.0089,0.5279;0.0263,0.6439]

Conclusión: Difusión en el espacio euclidiano normal para todos los tamaños moleculares

Atelocolágeno	A	b	R cuadrado	CI (a;b)
2 MDa	0.17026	0.328441	0.840058	[0.0927,0.2735;0.2478,0.3834]
10 kDa	0.281443	0.279144	0.808817	[0.1668,0.2296;0.3961,0.3287]

Conclusión: Puede ocurrir en espacios altamente desordenados muy diferentes al grupo de percolación.

Telómero	A	b	R cuadrado	CI (a;b)
2MDa	0.001083	0.876103	0.954832	[0.0002,0.7883;0.0019,0.9639]
500 kDa	0.000405	0.984194	0.946009	[2.1507e-05,0.8744;0.0008,1.0939]
40 kDa	0.003291	0.778927	0.973534	[0.0016,0.7193;0.0050,0.8386]
10 kDa	0.008298	0.675238	0.973083	[0.0047,0.6244;0.0118,0.7260]

Conclusión: Difusión en sustrato euclidiano normal con contribución de otro mecanismo de liberación para todos los tamaños moleculares excepto 10 kDa, que muestra difusión en el espacio euclidiano normal

Oligómero	A	b	R cuadrado	CI (a;b)
2MDa	0.001157	0.870807	0.942191	[0.0002,0.7715;0.0021,0.9701]
500 kDa	0.000473	0.96695	0.951171	[5.3077e-05,0.8640;0.0009,1.0699]
40 kDa	0.002865	0.795155	0.964108	[0.0011,0.7237;0.0046,0.8666]
10 kDa	0.006484	0.70258	0.963082	[0.0030,0.6401;0.0099,0.7650]

Conclusión: Difusión en sustrato euclidiano normal con contribución de otro mecanismo de liberación para todos los tamaños moleculares excepto 10 kDa, que muestra difusión en el espacio euclidiano normal

Ejemplo 6: Efecto de la relación oligómero: atelocolágeno en la cinética de polimerización

5 Para determinar si la relación oligómero: atelocolágeno tenía un efecto en la cinética de polimerización de la matriz de fibrillas de colágeno, las matrices se polimerizaron sin FITC-Dextrano en el reómetro AR2000 utilizando el procedimiento descrito en el Ejemplo 2. Se prepararon cinco combinaciones de matrices diferentes combinando oligómero soluble y bloque de construcción de atelocolágeno en una relación de 0:100, 25:75, 50:50, 75:25 y 100:0 antes de la polimerización. Las curvas de polimerización resultantes y las tasas de polimerización calculadas y T50% se muestran en la FIG. 9. En particular, se monitorizaron los cambios en función del tiempo en el módulo de almacenamiento por cizallamiento, ya que las formulaciones de colágeno presentaban una transición de solución a matriz tras un aumento de temperatura de 4 °C a 37 °C. Los perfiles de polimerización (A) se utilizaron para cuantificar la tasa inicial de polimerización (media \pm SD, B) y los tiempos de semipolimerización (media \pm SD, C) para N = 3 de cada tipo de matriz.

15 Se observó en la FIG. 9 que las diferentes combinaciones de matrices mostraron diferentes perfiles de polimerización ($p < 0.05$, $N=3$). Los valores de rigidez de las matrices formadas aumentaron a medida que aumentó el porcentaje de oligómero (FIG. 9A). La tasa de polimerización aumentó (FIG. 9B) y T50% disminuyó (FIG. 9C) con contenido creciente de oligómeros. Se observaron tiempos de polimerización rápidos (T50% < 5 minutos) para todas las relaciones oligómero: atelocolágeno excepto 0:100.

Curiosamente, todas las combinaciones de matrices mostraron una polimerización rápida ($T_{50\%} < 5$ minutos), excepto la matriz con una relación oligómero: atelocolágeno de 0:100 (atelocolágeno puro) (FIG. 9C). La polimerización rápida de fibrillas de colágeno es una característica de diseño importante. En aplicaciones clínicas, es necesario que las soluciones de colágeno inyectadas se polimericen rápidamente para crear una matriz sólida que permita la colocación adecuada de la matriz y la administración molecular *in situ*, una característica que no presentan muchas formulaciones de colágeno convencionales. Estos resultados indicaron que con el uso de diferentes combinaciones de bloques de construcción de oligómeros y atelocolágeno, se pueden preparar matrices con diferente rigidez mientras se conserva su potencial de polimerización en 5 minutos (excepción: Matriz de atelocolágeno 100%).

10 **Ejemplo 7: Modulación de la cinética de liberación de la matriz mediante la variación de la relación compositiva de los bloques de construcción moleculares oligómeros y atelocolágeno**

Las diferentes microestructuras y la degradación proteolítica obtenidas para matrices con diferentes combinaciones de proporciones oligómero: atelocolágeno implicaron que la modulación en la composición de la matriz se traduciría en sus diferentes perfiles de liberación de agentes. Se planteó la hipótesis de que la modulación de la composición de la matriz utilizando bloques de construcción de oligómeros y atelocolágeno podría ajustar la cinética de liberación molecular de matrices de baja densidad de fibrillas (3 mg/ml). Para comprobar esto, se formularon matrices de fibrillas de colágeno con combinaciones de oligómero: atelocolágeno en una relación de 0:100, 5:95, 10:90, 15:85, 20:80, 25:75, 50:50, 75:25 y 100:0%. Estas matrices se mezclaron con 0.5 mg/ml de 1) moléculas de FITC-Dextrano de 10 kDa en un subconjunto y 2) moléculas de FITC-Dextrano de 2 MDa en otro subconjunto, y se estudió su liberación en ausencia o presencia de 10 U/ml de colagenasa.

Los resultados mostraron que las matrices de colágeno de baja densidad de fibrillas (3 mg/ml) dieron perfiles de liberación por difusión similares (FIG. 10A para 10 kDa y 10C para 2 MDa) pero diferentes perfiles de liberación dependientes de colagenasa (FIG. 10B para 10 kDa y 10D para 2 MDa). Los perfiles de liberación también mostraron un tiempo mejorado para la liberación completa de 2 MDa FITC-Dextrano en comparación con las moléculas de 10 kDa FITC-Dextrano (FIG. 10C y D). Esto implica la tendencia de las matrices a retener moléculas de mayor tamaño durante más tiempo dentro de ellas que las moléculas de menor tamaño.

Ejemplo 8: Liberación molecular de materiales de fibrillas de colágeno de alta densidad

Se ha establecido previamente que la densidad de fibrillas de colágeno aumenta y el tamaño de los poros disminuye a medida que aumenta la concentración de bloques constructores de colágeno soluble. También se sabe que la difusión molecular y la degradación proteolítica disminuyen con el aumento de la densidad de fibrillas de colágeno. Como tal, se planteó la hipótesis de que la liberación de las matrices de fibrillas de colágeno sintéticas se prolongaría al aumentar la concentración de bloques de construcción de colágeno soluble premezclados. Para probar esto, las matrices de fibrillas de colágeno de oligómero se prepararon a densidades bajas (3 mg/ml) y altas (15.6 mg/ml). Las matrices de baja densidad se prepararon como se describió anteriormente. Se prepararon matrices de alta densidad sometiendo matrices de fibrillas de colágeno de 3 mg/ml a una compresión confinada para lograr una reducción de volumen de 5.2X. Se prepararon cilindros de diámetro 1.1 (espesor 2.6 mm) de cada tipo de matriz y se comparó la cinética de liberación.

Ejemplo 9: Creación de dispositivos de administración de fibrillas de colágeno de alta densidad

Se deseaba crear matrices de colágeno con mayor densidad de fibrillas sin comprometer su capacidad para soportar e inducir la infiltración celular y la regeneración tisular. Con este fin, se ha demostrado que las matrices de oligómeros tienen una ventaja en la creación de materiales similares a tejidos sin reducir la porosidad hasta un punto que las células no puedan infiltrarse en ellos. Por lo tanto, las matrices de colágeno oligomérico se densificaron como un estudio de prueba de concepto. En particular, la concentración efectiva de oligómeros, que se traduce en densidad de fibrillas, de las matrices polimerizadas se incrementó mediante el método de compresión confinada desarrollado por el laboratorio de Harbin. Se muestra un esquema del proceso para crear una matriz de alta densidad de fibrillas mediante compresión confinada de acuerdo con las enseñanzas de la presente invención que se muestra en la FIG. 14. Brevemente, se pipetearon 10.82 ml de colágeno oligomérico soluble (3 mg/ml) mezclado con 2 MDa o 10 kDa de FITC-Dextrano en moldes de compresión (2 cm de ancho por 4 cm de largo). Las soluciones se polimerizaron durante la noche a 37 °C para crear matrices de fibrillas de colágeno con un espesor de 13.52 mm. Las matrices polimerizadas con FITC-Dextrano mezclado se sometieron a compresión confinada utilizando una placa de polietileno poroso (poro de 50 micrómetros) a 6 mm/min hasta alcanzar un espesor final de 2.6 mm (2 cm de ancho por 4 cm de largo). La concentración final de matrices de colágeno comprimidas fue de 15.6 mg/ml (compresión de 5.2X). Se prepararon cilindros de diámetro 1.1 (espesor 2.6 mm) a partir de matrices de baja densidad (3 mg/ml) y alta densidad (15.6 mg/ml). Los perfiles de liberación molecular se midieron en presencia de 50 U/ml de colagenasa para muestras triplicadas de cada formulación de matriz.

Ejemplo 10: Validación de la extensión de la liberación molecular del colágeno oligomérico densificado

Se compararon las matrices de colágeno formuladas de densidad alterada (3 mg/ml = baja; y 15.6 mg/ml = alta) para la liberación molecular de 10 kDa y 2 MDa de FITC-Dextrano cada una, como se muestra en la FIG. 11. En particular, se mezcló FITC-Dextrano de 10 kDa y 2 MDa en matrices de oligómeros de 3 mg/ml y 15.6 mg/ml. Se midió la cinética de liberación de ambas matrices tras la exposición a 50 U/ml de colagenasa. Como se esperaba, la diferencia entre los perfiles de liberación exhibidos por la formulación de matriz de baja densidad y alta densidad se mejora para 2 MDa FITC-Dextrano (D) en comparación con 10 kDa FITC-Dextrano (A). La tasa inicial de liberación es significativamente menor en matrices de alta densidad en comparación con las matrices de baja densidad tanto para FITC-Dextranos de 10 kDa (B) como de 2 MDa (E). El T50% de liberación es significativamente mayor en matrices de alta densidad que en matrices de baja densidad tanto para FITC-Dextrano de tamaño más pequeño (10 kDa) como para tamaño más grande (2 MDa) como se ve en la FIG. 10E y 10F. Los resultados mostraron que la liberación de FITC-Dextrano de matrices comprimidas fue significativamente más prolongada en comparación con las muestras no comprimidas para ambos 10 kDa (FIG. 11A) y 2 MDa (FIG. 11D) FITC-Dextranos. También se observó una disminución en la tasa inicial de liberación y un aumento en los valores de T50% con una mayor densidad de fibrillas de colágeno, tanto para 10 kDa (FIG. 11B, C) y 2 MDa (FIG. 11E, F) FITC-Dextranos. De este experimento se concluyó que la densificación de las matrices de colágeno modula la liberación molecular de las matrices de fibrillas de colágeno.

Ejemplo 11: Efecto de la densidad de matrices de fibrillas de colágeno oligómero sobre la liberación de FITC-dextrano de 10 kDa y 2 MDa

Para definir mejor cómo la densidad de las matrices de fibrillas de colágeno oligomérico afecta la liberación del agente, se mezclaron FITC-dextranos de 10 kDa y 2 MDa a una concentración de 0.25 mg/ml dentro de matrices preparadas en un rango de densidad de 3 mg/ml a 40 mg/ml. Las matrices de oligómeros preparadas a 3 mg/ml se prepararon como se describió anteriormente en ausencia de compresión confinada, mientras que las matrices de 20 mg/ml y 40 mg/ml se prepararon mediante la aplicación de compresión confinada a matrices de 4.05 mg/ml. Brevemente, se mezclaron 10.39 ml y 20.78 ml de colágeno oligomérico neutralizado (4.05 mg/ml) con FITC-dextrano de 10 kDa o 2 MDa (0.25 mg/ml) y se pipetearon en moldes de compresión (2 cm de ancho por 4 cm de largo). Las soluciones se polimerizaron durante la noche a 37°C para formar matrices de 1.3 cm y 2.6 cm de espesor respectivamente. Luego, estas matrices se sometieron a una compresión confinada utilizando una platina de polietileno poroso hasta un espesor final de 0.26 cm para lograr una densificación de 4.84X (20 mg/ml) y 9.88X (40 mg/ml). Se prepararon cilindros de diámetro 1.1 (espesor 0.263 cm) a partir de todas las matrices y se utilizaron para medir la cinética de liberación en presencia o ausencia de colagenasa (10 U/ml). Todas las mediciones se realizaron en muestras triplicadas. Se trazaron y analizaron los perfiles de liberación para determinar el tiempo necesario para una liberación acumulada del 50 % (T50 %), que se calculó basándose en el ajuste de Weibull. Los parámetros de Weibull resultantes se utilizaron para definir el mecanismo de liberación.

Las matrices de fibrillas de colágeno oligomérico mostraron un efecto dependiente de la densidad sobre la liberación molecular de FITC-dextranos de 10 kDa y 2 MDa en presencia de 50 U/ml de colagenasa como se muestra en las FIGS. 17 y 19. Para ambos FITC-dextranos, se observó un aumento en T50% con el aumento de la densidad. Como se esperaba, el rango dinámico de liberación dependiente de la densidad fue mayor para 2MDa FITC-dextrano. Además, el FITC-dextrano de 10 kDa mostró valores T50% disminuidos en comparación con el FITC-dextrano de 2 MDa para todas las matrices analizadas. Curiosamente, el análisis de Weibull indicó que los mecanismos de liberación de 10 kDa para matrices de oligómeros de 3 mg/ml y 20 mg/ml involucraban tanto difusión como degradación. Por otra parte, la mayor resistencia a la degradación de la colagenasa demostrada por matrices de oligómeros de 40 mg/ml resultó en un mecanismo de liberación de difusión de solo 10 kDa. Por el contrario, todas las formulaciones de matriz analizadas exhibieron mecanismos de liberación de FITC-dextrano de 2 MDa regidos tanto por la difusión como por la degradación.

La evaluación de la liberación dependiente de la densidad de FITC-dextrano de 10 kDa en ausencia de colagenasa también mostró un aumento progresivo en los valores de T50% en función de la concentración de oligómero o la densidad de la matriz como se muestra en la FIG 18. Como era de esperar, los valores de T50% obtenidos en ausencia de colagenasa fueron menores que los medidos en presencia de colagenasa (FIG 17). Los parámetros de Weibull indicaron que la liberación de FITC-dextrano de 10 kDa involucró principalmente la difusión para 3 mg/ml y 20 mg/ml, mientras que la liberación de matrices de 40 mg/ml involucró la difusión y algún otro mecanismo. Este experimento validó y definió aún más cómo las matrices de colágeno densificantes modulan la liberación molecular de las matrices de fibrillas de colágeno.

Ejemplo 12: Preparación y caracterización de polímeros de colágeno

Las pieles de cerdo con peso de mercado se obtuvieron de fuentes de procesamiento de carne comercial de acuerdo con las pautas del Purdue University Animal Care and Use Committee (PACUC) El colágeno oligomérico se extrajo de la dermis como se describió anteriormente (Kreger et al, (2010) Biopolymers 93:690-707, incorporado en el presente documento por referencia). El colágeno rico en monómeros (telocolágeno) se preparó extrayendo piel de cerdo con ácido acético 0.5 M seguido de precipitación con sal. Las regiones telepeptídicas dentro de la molécula de colágeno, que contienen sitios de entrecruzamiento intermolecular, se eliminaron enzimáticamente mediante digestión completa con pepsina. Todos los colágenos se dializaron

exhaustivamente contra ácido acético 0.1 M y luego liofilizados. Antes de su uso, los colágenos liofilizados se disolvieron en HCl 0.01 N. Todos los colágenos se asepsaron mediante exposición al cloroformo durante la noche a 4 °C. La concentración de colágeno se determinó mediante un ensayo con Rojo Sirio (Direct Red 80). Las formulaciones de colágeno se estandarizaron basándose en la pureza y la capacidad de polimerización. Aquí, la capacidad de polimerización se define como la relación entre el módulo de almacenamiento de cizallamiento (G') de las matrices polimerizadas y el contenido de colágeno de la reacción de polimerización. El colágeno monómero comercial, colágeno tipo I solubilizado en ácido extraído de colas de rata, se adquirió de BD Biosciences (Bedford, MA, conocido como colágeno de cola de rata BD, BD-RTC).

Ejemplo 13: Preparación de matrices de colágeno-fibrillas

Para la preparación de matrices fibrilares de colágeno en 3D, los colágenos se diluyeron en HCl 0.01 N y luego se neutralizaron con solución salina tamponada con fosfato (PBS, 10X, pH 7.4) e hidróxido de sodio 0.1 N (NaOH) para lograr un pH neutro (7.4) y una concentración final de colágeno de 3 mg/ml. Para formular matrices con FITC-Dextrano, se aplicó un proceso de polimerización similar y se predisolvió FITC-Dextrano (10 kDa, 40 kDa, 500 kDa o 2 MDa Invitrogen, Eugene, OR) en PBS 10X para obtener una concentración final de 0.5 mg/ml dentro de la matriz polimerizada. La preparación de matrices con diferentes proporciones de oligómero: monómero implicó la neutralización de cada componente a 3 mg/ml con 0.5 mg/ml de FITC-Dextrano y luego variar la proporción de volumen para lograr 0:100, 25:75, 50:50, 75:25 y 100:0 antes de la polimerización.

Las soluciones de colágeno neutralizadas se mantuvieron en hielo antes de la inducción de la polimerización, calentándolas a 37 °C. En otros experimentos, la temperatura de la placa del reómetro se mantuvo por debajo de 10 °C durante 5 minutos para obtener el módulo de almacenamiento de referencia de las matrices no polimerizadas, y posteriormente se aumentó a 37 °C. Debido al aumento de la viscosidad de las soluciones de colágeno, se utilizaron pipetas de desplazamiento positivo (Microman, Gilson, Middleton, WI) para pipetear con precisión todas las soluciones de colágeno. Para confirmar que la adición de FITC-Dextrano no tuvo efecto sobre la cinética de polimerización del colágeno y las propiedades físicas de la matriz, se prepararon matrices en ausencia y presencia de FITC-Dextranos (10 kDa y 2 MDa, 0.5 mg/ml). Los cambios dependientes del tiempo en las propiedades viscoelásticas (módulo de almacenamiento de cizallamiento (G'), módulo de pérdida de cizallamiento (G'') y delta de desplazamiento de fase (δ) durante la polimerización se midieron en cizallamiento oscilatorio utilizando un reómetro AR2000 (TA Instruments, New Castle, DE) adaptado con una geometría de placa paralela de acero inoxidable de 40 mm de diámetro). Luego se compararon la cinética de polimerización y las propiedades viscoelásticas de matrices preparadas en presencia y ausencia de FITC-dextrano.

Ejemplo 14: Medición de la cinética de liberación

Se polimerizaron matrices de colágeno (3 mg/ml) que contenían FITC-Dextrano de diversos tamaños a una concentración de 0.5 mg/ml en placas de 48 pocillos (250 J.Illwell). Luego, las muestras se cubrieron con 750 μ l de PBS, pH 7.4 que no contenía colagenasa ni 125 U/ml de bacterias de *Clostridium histolyticum* colagenasa (CLS4, Worthington Biomchemical Corporation, Lakewood, NJ). Las placas se sometieron a una rotación gradual a 60 rpm en un rotador clínico Fisher Scientific. El sobrenadante de cada muestra se recogió a intervalos de tiempo específicos y se reemplazó con soluciones nuevas. Los intervalos de muestreo se predijeron basándose en curvas de liberación simuladas para cada tamaño de molécula, modeladas utilizando la ecuación de difusión proporcionada por Siepmann et al. Se utilizó un espectrofluorómetro (Molecular Devices Spectramax M5) para medir la fluorescencia en una longitud de onda de excitación y emisión de 493 y 530 nm respectivamente. Este proceso se repitió hasta que las unidades de fluorescencia relativa del sobrenadante de los pocillos coincidieron con la fluorescencia inicial (PBS más/menos colagenasa que no contiene FITC-Dextrano), lo que indica la finalización de la liberación de FITC-Dextrano.

Los datos recopilados se utilizaron para representar gráficamente el % de liberación acumulada frente al tiempo en minutos. Se utilizaron dos parámetros para definir las curvas de liberación -tasa de liberación y T50 % de liberación-. La tasa inicial de liberación se definió como la pendiente de la curva de liberación analizada a lo largo del tiempo necesario para alcanzar el 25% de la liberación acumulada, obtenida mediante el ajuste de línea de tendencia lineal en Microsoft Excel. El T50% de liberación, definido como el tiempo necesario para obtener el 50% de liberación acumulada, se obtuvo a partir de los mejores ajustes de potencia de las curvas de liberación en Matlab (Mathworks).

Todos los análisis estadísticos se realizaron en MiniTab. La comparación entre colagenasa y PBS se realizó con una prueba T de Student de 2 muestras con un intervalo de confianza del 95%. Las comparaciones entre el tamaño del fármaco y la composición de la matriz se realizaron con ANOVA y prueba post-hoc de Tukey con un intervalo de confianza del 95%.

REIVINDICACIONES

1. Un dispositivo de administración terapéutica a base de colágeno que comprende:
una matriz de fibrillas de colágeno sintéticas insolubles que comprende un producto de polimerización de una mezcla de colágeno oligomérico soluble con uno o más tipos de moléculas de colágeno no oligomérico soluble;
y
un primer agente activo disperso en toda la matriz de fibrillas de colágeno o dentro de una porción de la matriz de fibrillas de colágeno;
en donde la matriz de fibrillas de colágeno exhibe una rigidez de al menos 5 Pa; en donde el primer agente activo es un fármaco; y en donde la matriz no contiene células incrustadas.
2. El dispositivo de administración terapéutica de la reivindicación 1, en donde la matriz de fibrillas de colágeno comprende colágeno tipo I.
3. El dispositivo de administración terapéutica de la reivindicación 1, en donde el uno o más tipos de moléculas de colágeno no oligomérico soluble comprenden una o ambas moléculas de telocolágeno soluble y moléculas de atelocolágeno soluble.
4. El dispositivo de administración terapéutica de la reivindicación 1, en donde el dispositivo de administración terapéutica a base de colágeno es un injerto de tejido.
5. El dispositivo de administración terapéutica de la reivindicación 1, en donde el dispositivo de administración terapéutica a base de colágeno está liofilizado.
6. El dispositivo de administración terapéutica de la reivindicación 1, en donde las moléculas de colágeno oligomérico soluble y colágeno no oligomérico soluble están en una proporción dentro de un intervalo seleccionado del grupo que consiste en 5:95 a 10:90, 10:90 a 15:85, 15:85 a 20:80, 20:80 a 25:75, 25:75 a 50:50 y 50:50 a 75:25.
7. El dispositivo de administración terapéutica de la reivindicación 1, que comprende además un segundo agente activo disperso por toda la matriz de fibrillas de colágeno o dentro de una porción de la matriz de fibrillas de colágeno; en donde el segundo agente activo es un fármaco.
8. El dispositivo de administración terapéutica de la reivindicación 1, en donde la matriz de fibrillas de colágeno incluye una primera porción que tiene una primera densidad y una segunda porción que tiene una segunda densidad; en donde la primera densidad es diferente de la segunda densidad.
9. El dispositivo de administración terapéutica de la reivindicación 1, en donde la matriz de fibrillas de colágeno incluye una primera porción que tiene disperso en ella el primer agente activo y una segunda porción que tiene disperso en ella un segundo agente activo, en donde el primer agente activo y el segundo agente activo son fármacos diferentes, en donde el dispositivo de administración terapéutica exhibe un primer perfil de liberación para el primer agente activo y un segundo perfil de liberación para el segundo agente activo, y en donde el primer perfil de liberación es diferente del segundo perfil de liberación.
10. El dispositivo de administración terapéutica de la reivindicación 1, en el que el dispositivo de administración terapéutica a base de colágeno está formado como un material de injerto de tejido implantable.

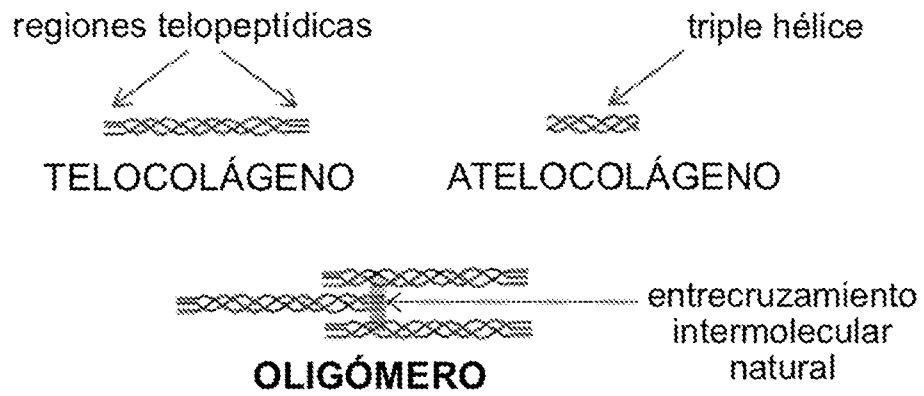


FIG. 1

Formulación de matriz a base de colágeno para la administración de FITC-Dextrano

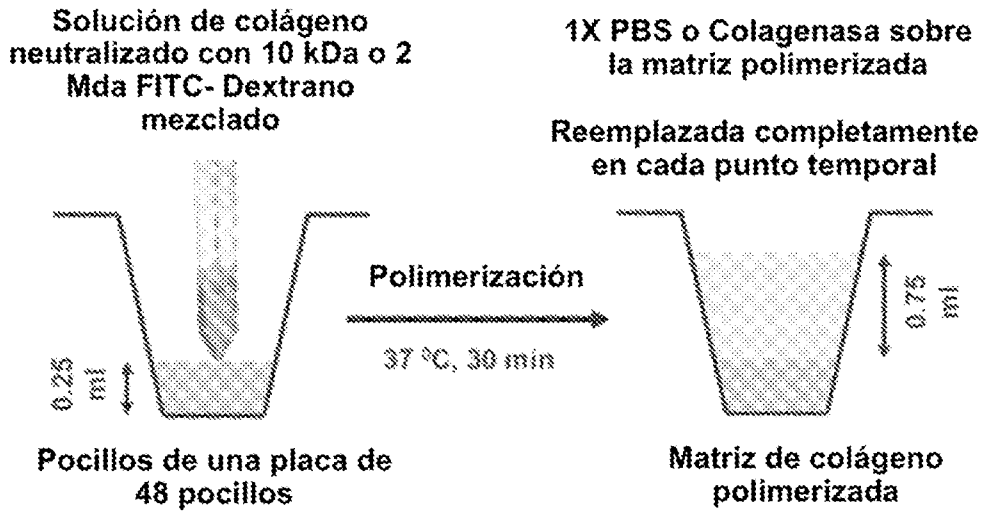


FIG. 2

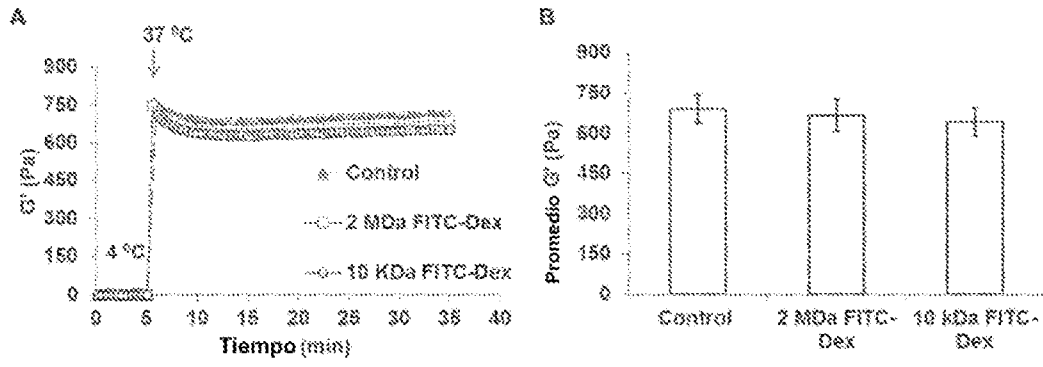


FIG. 3

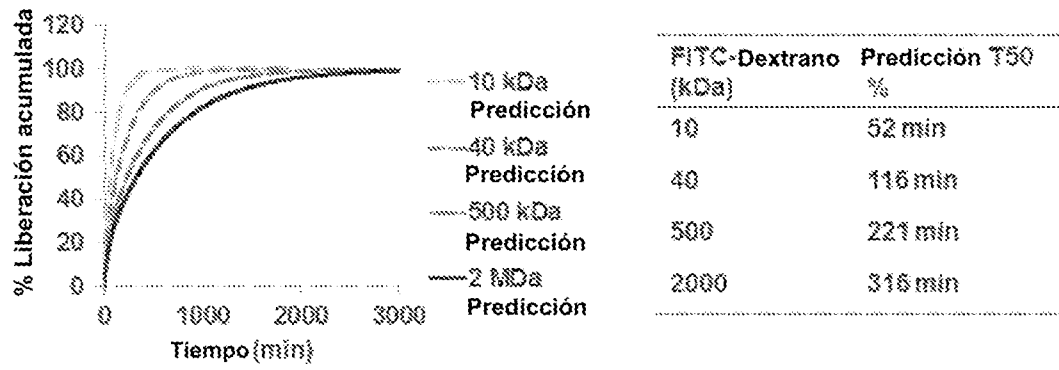


FIG. 4

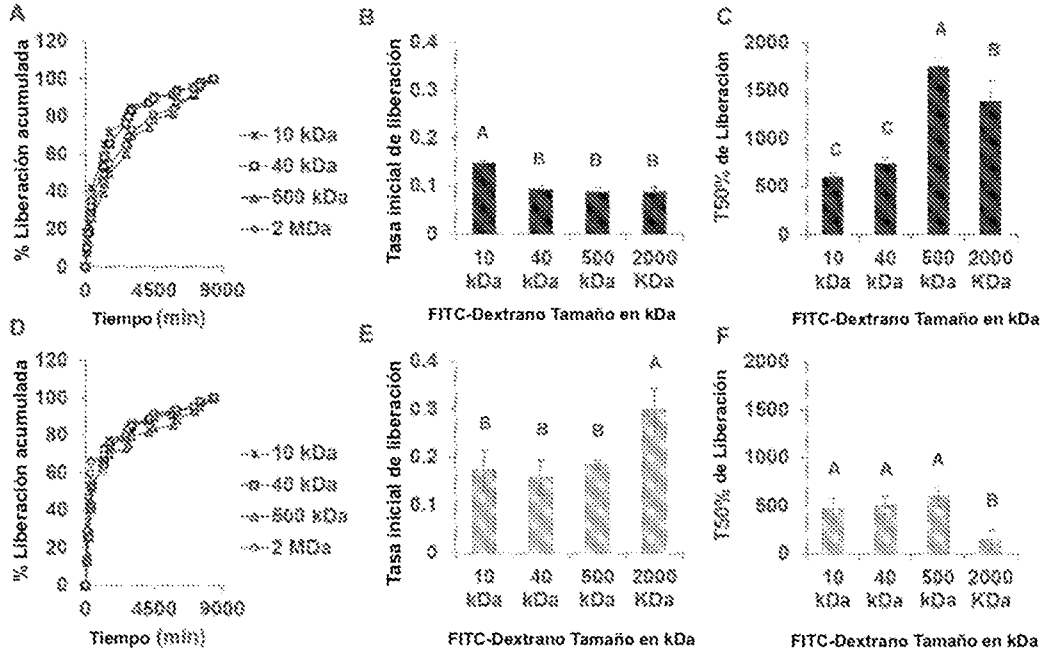


FIG. 5

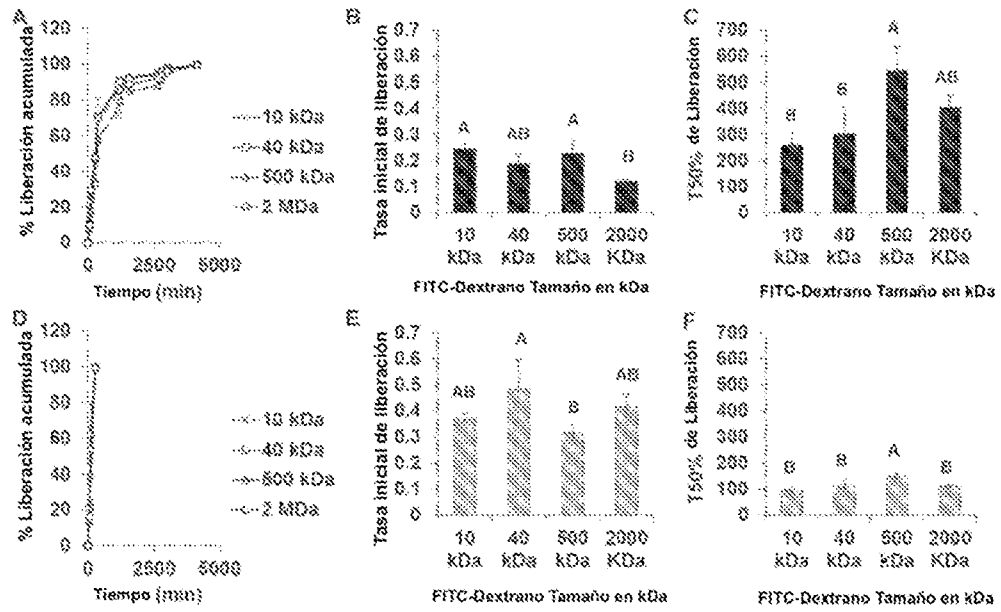


FIG. 6

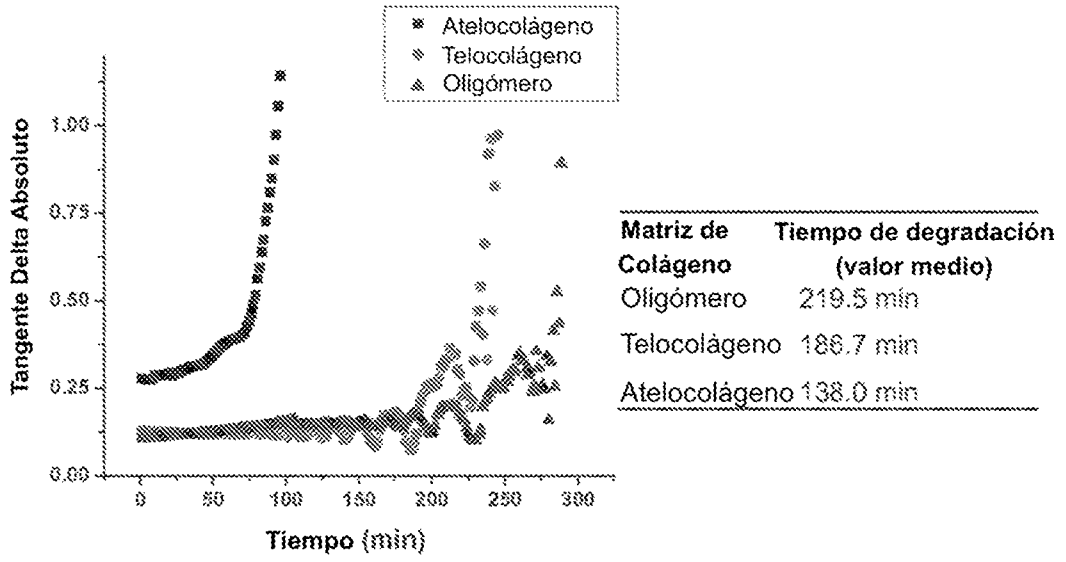


FIG. 7

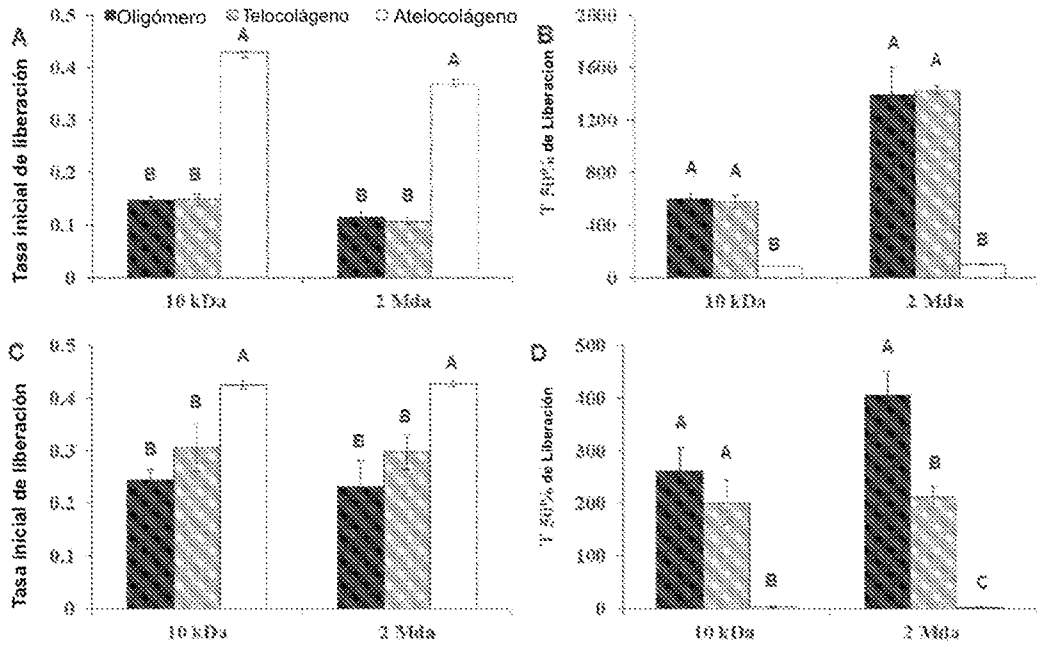


FIG. 8

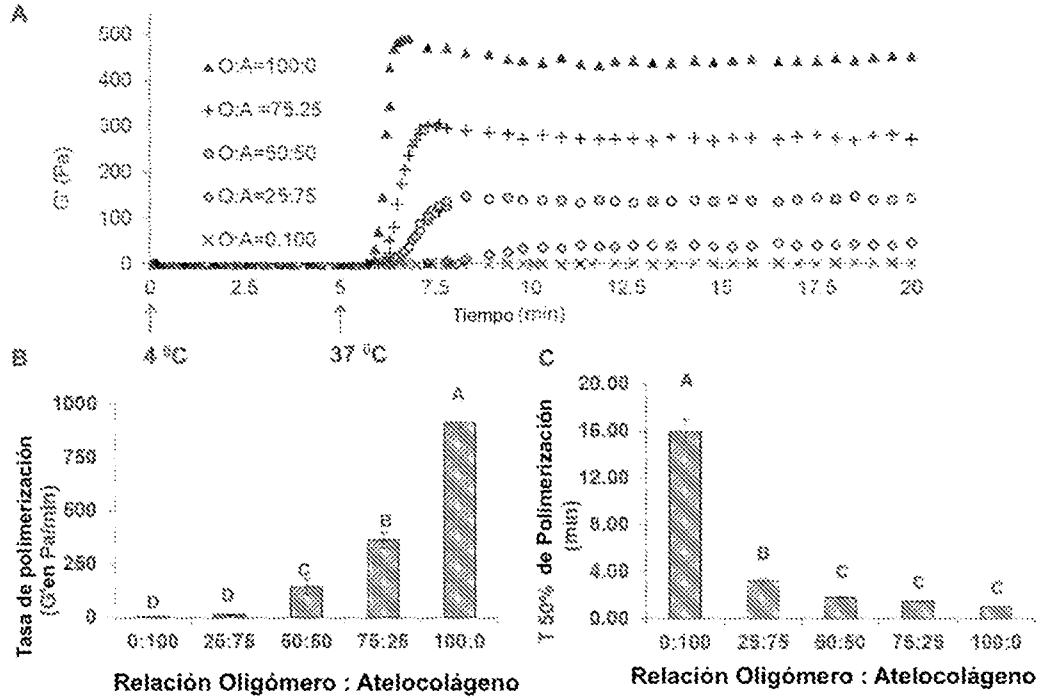


FIG. 9

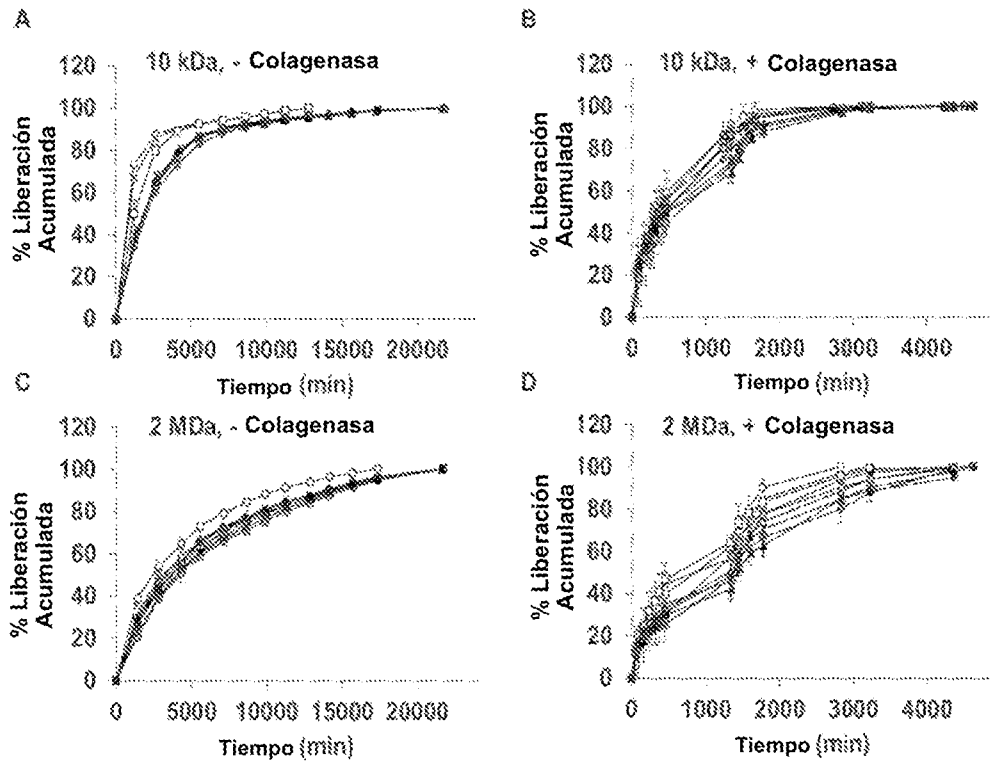


FIG. 10

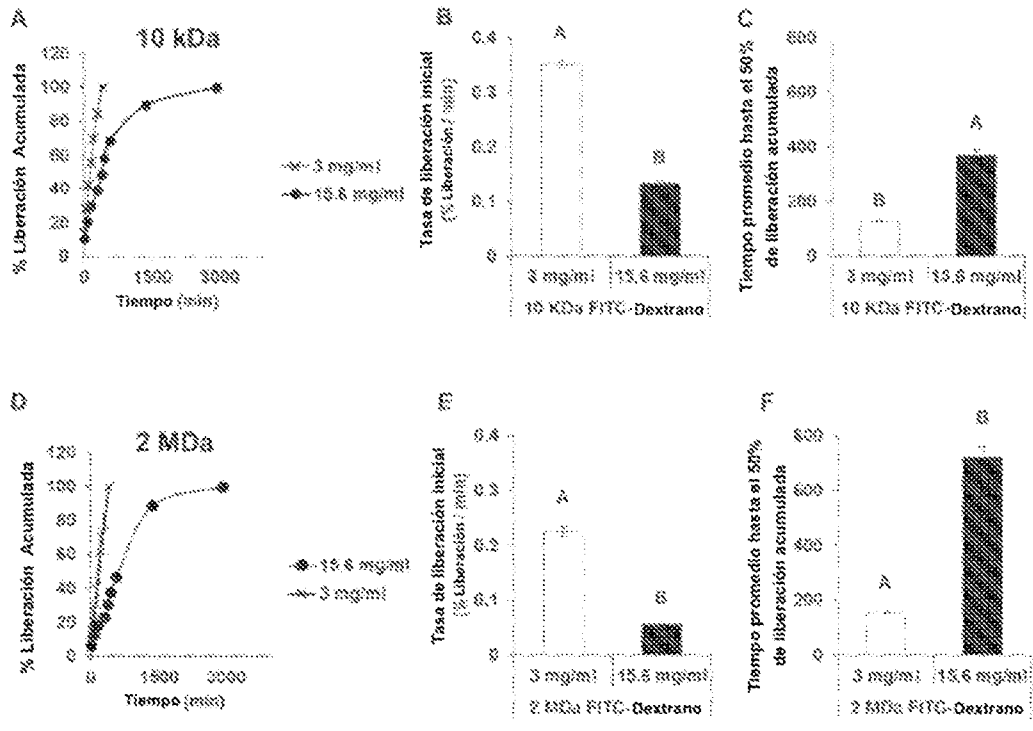


FIG. 11

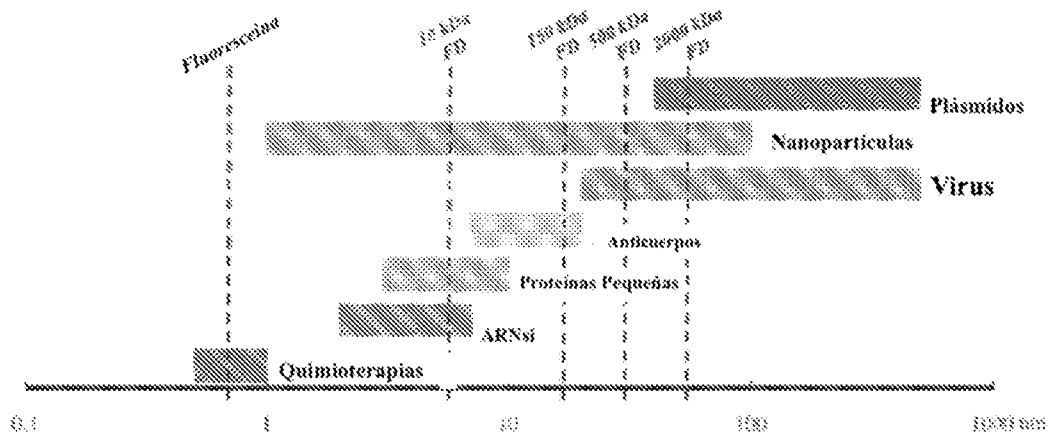


Fig. 2. Tamaño de la fluoresceína, 10kDa, 150kDa, 500 kDa, y 2000 kDa FITC-Dex (FD) en relación con las categorías de fármacos clínicamente importantes.

FIG. 12

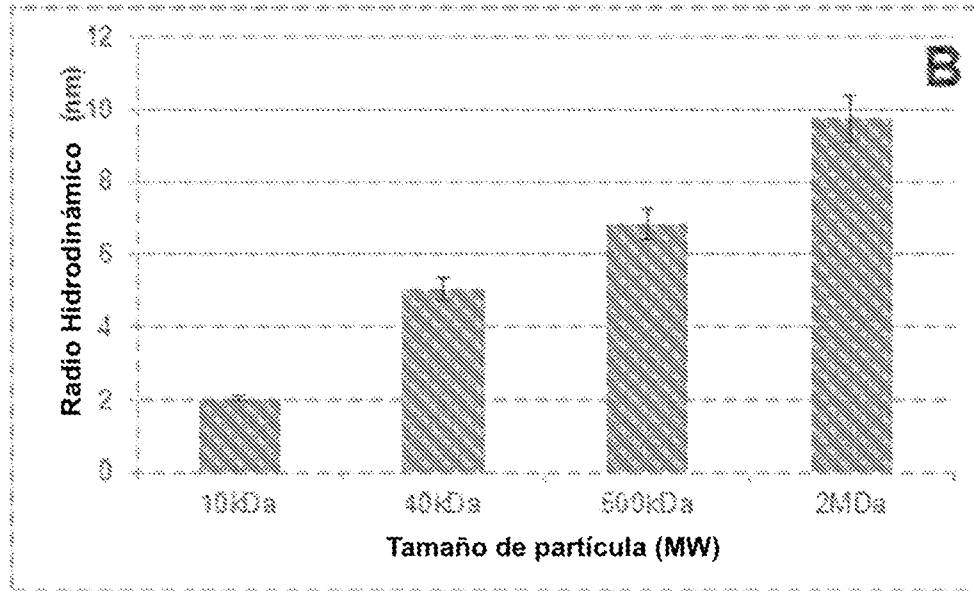


FIG. 13

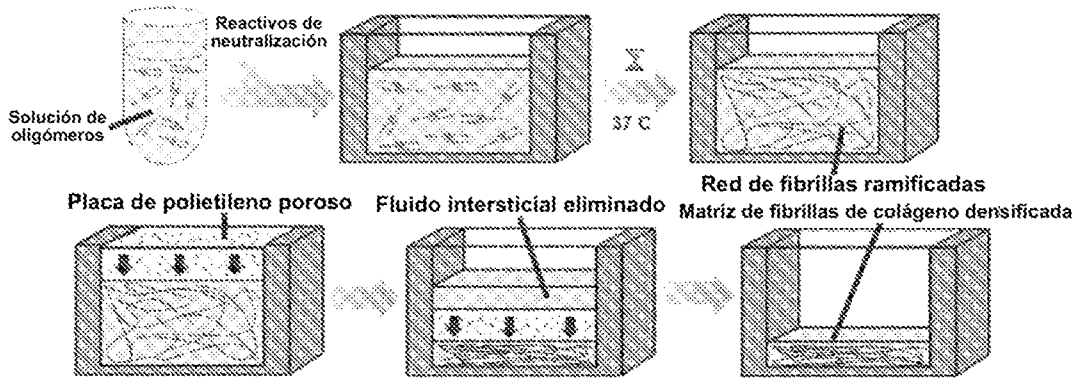


FIG. 14

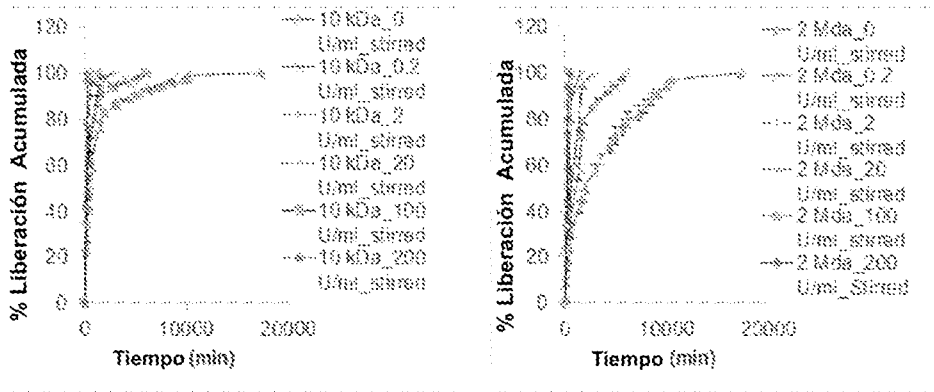


FIG. 15

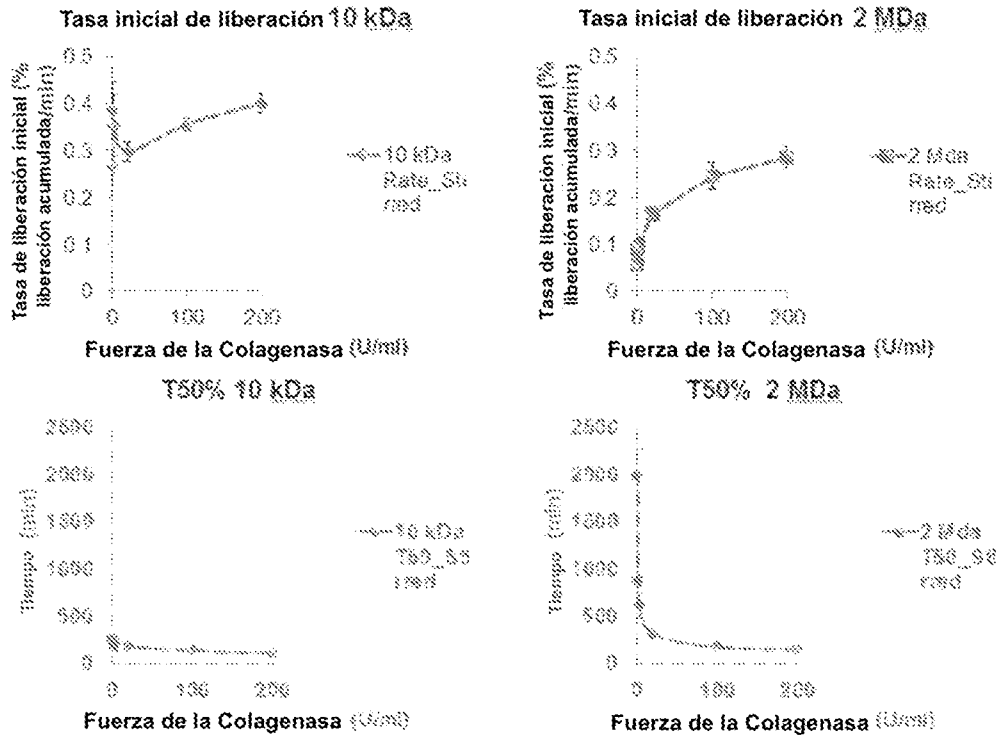


FIG. 16

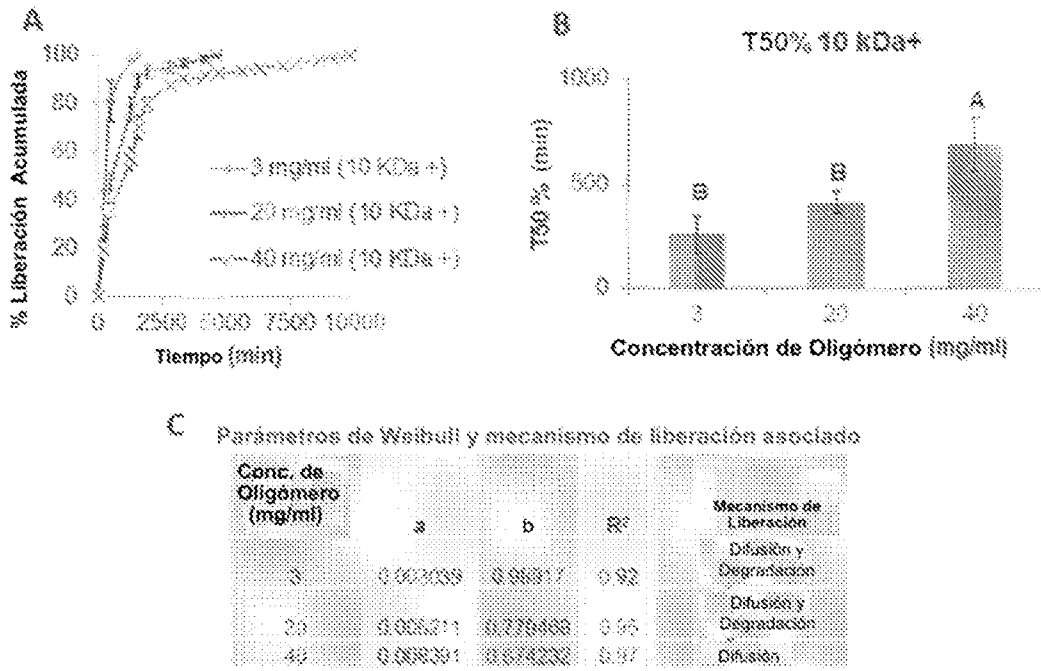
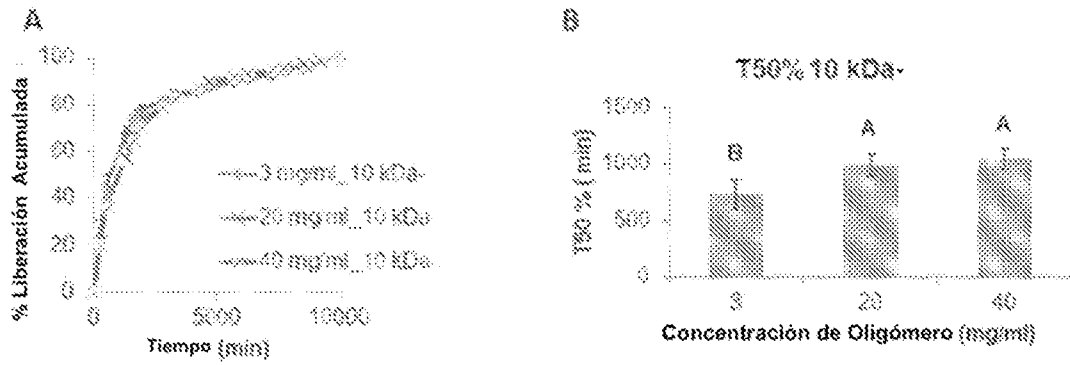


FIG. 17



C Parámetros de Weibull y mecanismo de liberación asociado

Conc. de Oligómero (mg/ml)	α	β	R^2	Mecanismo de Liberación
3	0.010002	0.833002	0.94	Difusión
20	0.005054	0.752352	0.97	Difusión
40	0.002607	0.780788	0.99	Difusión con contribución de otro mecanismo.

FIG. 18

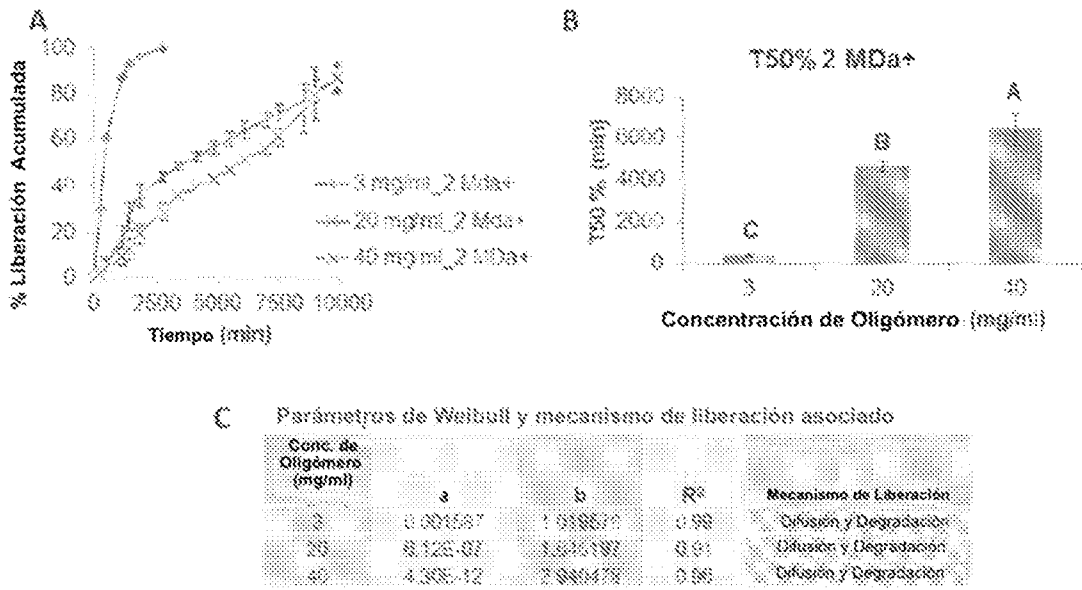


FIG. 19