

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **3 007 682**

51 Int. Cl.:

A61L 27/38 (2006.01)
A61F 2/30 (2006.01)
A61F 2/28 (2006.01)
C12N 5/077 (2010.01)
A61L 27/36 (2006.01)
A61L 27/24 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **11.08.2016 PCT/CN2016/094634**
- 87 Fecha y número de publicación internacional: **16.02.2017 WO17025054**
- 96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **11.08.2016 E 16834678 (1)**
- 97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **02.10.2024 EP 3334835**

54 Título: **Preparación de partículas de colágeno de alta pureza y uso de las mismas**

30 Prioridad:

11.08.2015 US 201562203904 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
20.03.2025

73 Titular/es:

**ACRO BIOMEDICAL COMPANY. LTD. (100.00%)
3rd FL., No.57, Luke 2nd Road, Lujhu District
Kaohsiung City 82151, TW**

72 Inventor/es:

**WANG, JUN-JIE;
TSAI, PEI-HUA;
KU, KAI-CHI y
HSIEH, DAR-JEN**

74 Agente/Representante:

IZQUIERDO BLANCO, María Alicia

Observaciones:

Véase nota informativa (Remarks, Remarques o Bemerkungen) en el folleto original publicado por la Oficina Europea de Patentes

ES 3 007 682 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

Preparación de partículas de colágeno de alta pureza y uso de las mismas

5 ANTECEDENTES DE LA INVENCION

1. CAMPO DE LA INVENCION

10 **[0001]** La presente divulgación en general se refiere al campo de los métodos para producir colágenos, en particular, métodos mejorados para producir partículas de colágeno adecuadas para su uso como andamios biológicos para que las células crezcan en ellos, como rellenos dérmicos para inyecciones durante una cirugía plástica (por ejemplo, una cirugía estética) para el aumento de tejidos blandos (por ejemplo, suavizar las líneas faciales y arrugas); o como apósitos para heridas para promover la cicatrización de heridas.

15 2. DESCRIPCIÓN DE LA TÉCNICA RELACIONADA

20 **[0002]** El colágeno es una proteína fibrosa insoluble que se encuentra en los vertebrados como principal constituyente de las fibrillas del tejido conjuntivo, como la piel. El proceso convencional de obtención de colágeno requiere mucho tiempo y es ineficaz, y a menudo destruye la integridad de los colágenos, lo que los hace inadecuados como andamiaje biológico si se pretende utilizarlos como implante en cirugía estética o en la cicatrización de heridas. Además, la mayoría de los colágenos disponibles en el mercado, como los que se venden con el nombre de Zyderm y Zyplast, se obtienen de piel de vaca, que no puede utilizarse en todos los pacientes debido a las graves reacciones alérgicas que provocan en una importante población de huéspedes, especialmente en aquellos con antecedentes de enfermedades autoinmunes. Además, el colágeno bovino no presenta una residencia prolongada en el lugar de la inyección, por lo que requiere inyecciones periódicas de retoque. Se cree que la corta permanencia del colágeno bovino se debe a que la integridad del colágeno se destruye cuando se extrae de las pieles de vaca, lo que hace que el colágeno sea fácilmente absorbido por el huésped.

30 **[0003]** Se han desarrollado colágenos de origen humano, como Cosmoderm y Cosmoplast, pero son muy caros debido a las fuentes limitadas de (es decir, prepucios humanos de circuncisiones). Como alternativa, los pacientes pueden utilizar colágeno derivado de su propio tejido adiposo extraído mediante procedimientos de liposucción y procesado en forma inyectable para su uso inmediato o almacenado para un uso futuro. Sin embargo, también adolecen del mismo defecto que el colágeno bovino, en el sentido de que la integridad del colágeno se destruye durante los procedimientos de aislamiento.

35 **[0004]** Un documento publicado, US 2015/037426 A, divulga un método para producir fragmentos de piel descelularizados a partir de tejidos blandos (por ejemplo, partículas de piel o tejidos adiposos) sometiendo los tejidos blandos a una solución hipertónica, que incluye un detergente, un emulsionante, un tensioactivo y, adicionalmente, una enzima. En un ejemplo preferible, la solución hipertónica es una solución salina de NaCl

40 **[0005]** En el documento US 2008/077251 A se describe un método para preparar injertos de cartílago acelular a partir de escamas de cartílago tratando las escamas de cartílago con una solución alcalina y un fluido supercrítico (SCF) para producir el injerto de cartílago acelular.

45 **[0006]** En consecuencia, existe en el arte relacionado la necesidad de un proceso mejorado para producir colágeno, en el que la estructura nativa y la conformación del colágeno se conservan durante los procedimientos de aislamiento, de modo que el producto de colágeno así producido puede servir como un andamio tridimensional para que las células huésped crezcan en él sin provocar una respuesta inmune significativa.

RESUMEN

50 **[0007]** La presente divulgación fue creada por los presentes inventores para superar los problemas mencionados anteriormente en la producción de partículas de colágeno, especialmente en la producción de partículas de colágeno caracterizadas por tener la conformación nativa de los colágenos de la piel de un animal (por ejemplo, la piel de un cerdo o una vaca).

55 **[0008]** El alcance de las reivindicaciones se define en las reivindicaciones. Cualquier referencia en la descripción a métodos de tratamiento se refiere a los productos de la presente invención para su uso en un método de tratamiento.

60 **[0009]** En consecuencia, se proporciona un método para preparar partículas de colágeno que comprenden las características de la reivindicación 1. Las realizaciones preferidas son el objeto de las reivindicaciones dependientes. El método comprende los pasos de,

(1) someter a un proceso de descelularización una piel animal con un grosor aproximado de 0,1-1 mm;

65 (2) someter la piel animal descelularizada de la etapa (1) al tratamiento de una solución acuosa que contenga un tensioactivo no iónico;

(3) someter la piel animal tratada con solución acuosa de la etapa (2) al tratamiento de una proteasa;

(4) someter la piel animal tratada con proteasa de la etapa (3) al tratamiento de una nucleasa;

(5) someter la piel animal tratada con nucleasas de la etapa (4) a un proceso de desionización;

(6) someter la piel animal desionizada de la etapa (5) a un proceso de eliminación química para producir una matriz de colágeno; y

(7) someter la matriz de colágeno de la etapa (6) a un proceso de granulación para producir la partícula de colágeno con un tamaño de aproximadamente 10-250 μm .

[0010] En el paso (1), la piel animal con un grosor aproximado de 0,1-1 mm se somete al tratamiento de un fluido supercrítico (SCF) bajo una presión aproximada de 10 - 50 MPa (100 - 500 bar) a una temperatura entre 30-50°C durante unos 20 min a 5 días.

[0011] El SCF es un dióxido de carbono supercrítico (scCO_2) o un óxido nitroso supercrítico (scN_2O). En un ejemplo, el SCF es scCO_2 . En otro ejemplo, el SCF es scN_2O .

[0012] De acuerdo con una realización preferida, el proceso de descelularización se lleva a cabo en una condición, en la que la temperatura es de aproximadamente 37 °C, y la presión es de aproximadamente 35 MPa (350 bar), durante 20 min.

[0013] En el paso (2), la piel animal descelularizada del paso (1) se trata con una solución acuosa que contiene un tensioactivo seleccionado del grupo que consiste en etoxilatos de octilfenol (por ejemplo, serie Triton X), monoestearato de sorbitán, polisorbato, poloxómero, nonoxinóles, alcohol cetílico y alquilpoliglucósido. Opcionalmente, la solución acuosa puede contener además un tensioactivo aniónico, como ácido lauril sulfónico, ácido dodecil sulfónico, dodecil sulfato sódico (SDS), ácido dodecil benceno sulfónico, ácido tridecil benceno sulfónico, ácido alquil-fenoxi benceno disulfónico, ácido naftaleno sulfónico, ácido alquil-naftaleno sulfónico y alquenil-naftaleno. Todavía opcionalmente, la solución acuosa puede comprender además una sal, tal como cloruro de sodio, cloruro de potasio, y similares. En un ejemplo preferido, el tensioactivo aniónico es dodecil sulfato sódico (SDS).

[0014] La proteasa de la etapa (3) se selecciona del grupo formado por pepsina, tripsina, quimotripsina, papaína, quimopapaína, bromelaína, actinidaína, proteinasa A, proteinasa K, peptidasa, ficina, calpaína, caspasa y una combinación de las mismas.

[0015] En el paso (4), la piel animal tratada con proteasa del paso (3) se trata con una nucleasa que es una nucleasa de ADN o una nucleasa de ARN.

[0016] Opcionalmente, el producto de la etapa (4) puede tratarse además con la solución acuosa de la etapa (2), que comprende un tensioactivo no iónico seleccionado del grupo formado por etoxilatos de octilfenol (por ejemplo, serie Triton X), monoestearato de sorbitán, polisorbato, poloxómero, nonoxinóles, alcohol cetílico y alquilpoliglucósido. En un ejemplo preferido, la solución acuosa comprende 1% de Triton X-100. También opcionalmente, la solución acuosa puede comprender además un tensioactivo aniónico, como ácido lauril sulfónico, ácido dodecil sulfónico, ácido dodecil benceno sulfónico, ácido tridecil benceno sulfónico, ácido alquil-fenoxi benceno disulfónico, ácido naftaleno sulfónico, ácido alquil-naftaleno sulfónico y alquenil-naftaleno. Aún opcionalmente, la solución acuosa puede comprender además una sal, como cloruro de sodio, cloruro de potasio, y similares. En un ejemplo preferido, el tensioactivo aniónico es dodecil sulfato sódico (SDS).

[0017] En el paso (5), la piel animal tratada con nucleasa del paso (4) se trata con una solución de peróxido de hidrógeno durante una hora.

[0018] En el paso (6), el proceso de eliminación química incluye someter el producto desionizado del paso (5) al tratamiento de un fluido supercrítico a una presión de unos 10 - 50 MPa (100 - 500 bar) a una temperatura entre 30-50°C durante unos 20 min a 5 días.

[0019] El fluido supercrítico es dióxido de carbono supercrítico (scCO_2) u óxido nitroso supercrítico (scN_2O). En un ejemplo, el SCF es scCO_2 . En otro ejemplo, el SCF es scN_2O .

[0020] El proceso de eliminación química se lleva a cabo en presencia de un co-disolvente que es el etanol. Este codisolvente puede aplicarse con SCF en una relación de volumen de 1:10 y en unas condiciones, en las que la temperatura es de unos 37°C, y la presión es de unos 35 MPa, durante unos 60 min.

[0021] Según otras realizaciones, en el paso (7), el proceso de granulación se lleva a cabo cortando o triturando la matriz de colágeno del paso (6) y produciendo así la partícula de colágeno que tiene un tamaño de partícula de aproximadamente 10-250 µm. La partícula de colágeno así producida está constituida por colágenos, en los que se conservan sus estructuras y conformaciones nativas, de modo que pueden servir como un bio-andamio tridimensional que permite el crecimiento de células en el mismo tras su aplicación sobre un sujeto.

[0022] Los detalles de una o más realizaciones de la presente divulgación se exponen en la descripción que se acompaña a continuación. Otras características y ventajas de la invención se desprenderán de las descripciones detalladas y de las reivindicaciones.

[0023] Debe entenderse que tanto la descripción general anterior como la descripción detallada siguiente son a modo de ejemplo, y tienen por objeto proporcionar una explicación más detallada de la invención tal como se reivindica.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

[0024] Los dibujos adjuntos, que se incorporan y forman parte de la especificación, ilustran varios ejemplos de sistemas, métodos y otras realizaciones ejemplificadas de varios aspectos de la invención. La presente descripción se entenderá mejor a partir de la siguiente descripción detallada leída a la luz de los dibujos adjuntos, donde,

La FIG. 1 es una fotografía electromicroscópica (EM) de la presente partícula de colágeno tomada respectivamente a un aumento de (A) 50 X, y (B) 20.000X, de acuerdo con una realización de la presente divulgación; y

FIG 2 son fotografías EM de la presente partícula de colágeno después de recelular células 3T3 durante (A) 12 hrs, y (B) 72 hrs de acuerdo con una realización de la presente divulgación, las fotos EM se toman respectivamente a un aumento de (A) 2,000 X y (B) 4,000 X.

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LAS REALIZACIONES PREFERIDAS

[0025] La descripción detallada que se proporciona a continuación en relación con los dibujos adjuntos pretende ser una descripción de la presente divulgación y no pretende representar las únicas formas en las que la presente divulgación puede construirse o utilizarse.

[0026] Las formas singulares "un", "y" y "el" se utilizan aquí para incluir referentes plurales a menos que el contexto dicte claramente lo contrario.

[0027] A pesar de que los rangos numéricos y los parámetros que establecen el amplio alcance de la invención son aproximaciones, los valores numéricos establecidos en los ejemplos específicos se reportan con la mayor precisión posible. Cualquier valor numérico, sin embargo, contiene inherentemente ciertos errores que resultan necesariamente de la desviación estándar encontrada en las respectivas mediciones de prueba. Además, tal como se utiliza en el presente documento, el término "aproximadamente" significa dentro del 10%, 5%, 1% o 0,5% de un valor o rango determinado. Alternativamente, el término "aproximadamente" significa dentro de un error estándar aceptable de la media cuando se considera por uno de habilidad ordinaria en el arte. Aparte de en los ejemplos de funcionamiento/trabajo, o a menos que se especifique expresamente lo contrario, todos los rangos numéricos, cantidades, valores y porcentajes tales como los de cantidades de materiales, duraciones de tiempo, temperaturas, condiciones de funcionamiento, proporciones de cantidades y similares que se describen en el presente documento deben entenderse modificados en todos los casos por el término "aproximadamente". Por consiguiente, a menos que se indique lo contrario, los parámetros numéricos expuestos en la presente divulgación y en las reivindicaciones adjuntas son aproximaciones que pueden variar según se desee. Como mínimo, cada parámetro numérico debe interpretarse a la luz del número de dígitos significativos indicados y aplicando técnicas ordinarias de redondeo.

[0028] La presente divulgación se refiere, entre otros, a un método novedoso para producir una partícula de colágeno, a la partícula de colágeno novedosa producida por el método y a un uso novedoso de la partícula de colágeno así producida.

[0029] La presente divulgación implica un método novedoso de producción de una partícula de colágeno, en el que la estructura nativa y la conformación del colágeno se conservan, por lo que puede proporcionar un microambiente óptimo para que las células del tejido huésped crezcan en él una vez que la presente partícula de colágeno se inyecta en el huésped.

[0030] En consecuencia, el presente método incluye al menos, los siguientes pasos,

- (1) someter a un proceso de descelularización una piel animal de un grosor aproximado de 0,1-1 mm;
- (2) someter la piel animal descelularizada de la etapa (1) al tratamiento de una solución acuosa que contenga un tensioactivo no iónico;
- (3) someter la piel animal tratada con solución acuosa de la etapa (2) al tratamiento de una proteasa;

(4) someter la piel animal tratada con proteasa de la etapa (3) al tratamiento de una nucleasa;

(5) someter la piel animal tratada con nucleasas de la etapa (4) a un proceso de desionización;

5 (6) someter la piel animal desionizada de la etapa (5) a un proceso de eliminación química para producir una matriz de colágeno; y

(7) someter la matriz de colágeno de la etapa (6) a un proceso de granulación para producir la partícula de colágeno que tiene un tamaño de aproximadamente 10-250 μm .

10 **[0031]** Antes de iniciar el presente método, la piel del animal, preferiblemente obtenida mediante el desollado de un animal, se lava, se le quita el pelo y se desgrasa. Preferiblemente, los animales adecuados para su uso en la presente divulgación son animales de granja, que incluyen, pero no se limitan a, cerdos, bovinos, vacas, toros, ovejas, cabras, burros, conejos, patos, gansos y aves de corral. El proceso de depilado y desengrasado puede llevarse a cabo mediante cualquier método mecánico o químico conocido en la técnica relacionada. Por ejemplo, los pelos pueden eliminarse tratando la piel del animal (por ejemplo, una corteza porcina) con un ácido, mientras que la grasa puede eliminarse tratando la piel del animal con una enzima (por ejemplo, una lipasa) o una sustancia química (por ejemplo, un detergente), o bien cortándola mecánicamente.

20 **[0032]** A continuación, se retira la capa superficial de la piel desgrasada y sin pelo mediante un dermatomo, de modo que se obtiene una piel animal con un grosor de entre 0,1 y 1 mm, por ejemplo, una piel animal con un grosor de entre 0,1 y 0,2 mm; 0,2, 0,3, 0,4, 0,5, 0,6, 0,7, 0,8, 0,9 y 1,0 mm; más preferiblemente, entre 0,2 y 0,6 mm, como 0,2, 0,3, 0,4, 0,5 y 0,6 mm; más preferiblemente, entre 0,3 mm. La piel animal así producida se utiliza entonces en el presente método.

25 **[0033]** Opcionalmente, la piel animal producida anteriormente, que tiene un grosor de entre 0,1 y 1 mm, se trata con un agente alcalino a una temperatura de entre 0-55°C durante unas 0,1-24 horas para eliminar cualquier resto de pelo y/o grasa. Algunos ejemplos de agentes alcalinos adecuados para el presente método son, entre otros, hidróxido de sodio, hidróxido de potasio, hidróxido de calcio, urea, sulfuro de sodio, tioacetato de calcio, etc. Preferiblemente, la piel animal es una corteza porcina que tiene un grosor de aproximadamente 0,1-0,6 mm, y se trata con una solución de hidróxido sódico de aproximadamente 0,1-1 N a 4°C durante aproximadamente 1 hora.

30 **[0034]** En el paso (1), la piel animal que tiene un grosor de entre 0,1-1 mm se somete a un proceso de descelularización. El proceso de descelularización se lleva a cabo con el fin de eliminar los materiales celulares de la piel animal, preservando al mismo tiempo las propiedades físicas y bioquímicas del colágeno, de modo que pueda servir mejor como andamio tisular. Por consiguiente, en el paso (1), la piel animal que tiene un grosor entre 0,1-1 mm se somete al tratamiento de un fluido supercrítico (SCF) a una presión de aproximadamente 10 - 50 MPa (100 - 500 bar), como por ejemplo 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49 y 50 MPa (100, 110, 120, 130, 140, 150, 160, 170, 180, 190, 200, 210, 220, 230, 240, 250, 260, 270, 280, 290, 300, 310, 320, 330, 340, 350, 360, 370, 380, 390, 400, 410, 420, 430, 440, 450, 460, 470, 480, 490 y 500 bar); preferentemente entre 15 y 45 MPa (150 y 450 bar), tales como 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, y 45 MPa (150, 160, 170, 180, 190, 200, 210, 220, 230, 240, 250, 260, 270, 280, 290, 300, 310, 320, 330, 340, 350, 360, 370, 380, 390, 400, 410, 420, 430, 440 y 450 bar); y más preferentemente de unos 20 - 40 MPa (200-400 bar), tales como 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39 y 40 MPa (200, 210, 220, 230, 240, 250, 260, 270, 280, 290, 300, 310, 320, 330, 340, 350, 360, 370, 380, 390 y 400 bar). Además, la etapa (1) se realiza a una temperatura comprendida entre 30-50°C, tales como 30, 31, 32, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49 y 50°C; preferentemente entre 35-45°C, tales como 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44 y 45°C; durante unos 20 min a 5 días, tales como 20, 30, 40, 50 y 60 min; 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23 y 24 h; 2, 3, 4 y 5 días. En algunos ejemplos, la piel animal que tiene un grosor entre 0,1 y 1 mm se trata con SCF durante aproximadamente 1 a 24 horas. En otros ejemplos, la piel animal que tiene un grosor entre 0,1 y 1 mm se trata con SCF durante aproximadamente 2 a 5 días.

50 **[0035]** El SCF puede ser dióxido de carbono supercrítico (scCO_2) u óxido nitroso supercrítico (scN_2O). En un ejemplo, el SCF es scCO_2 , ya que el scCO_2 tiene una condición crítica leve de 37°C a unos 35 MPa (350 bar), por lo que permite eliminar materiales biológicos a temperatura corporal o cercana a ella (es decir, 37°C). En otro ejemplo preferido, el SCF es scN_2O .

55 **[0036]** En la etapa siguiente (2), la piel animal descelularizada de la etapa (1) se lava con una solución acuosa que contiene un tensioactivo no iónico, a fin de eliminar cualquier materia celular residual. Ejemplos de tensioactivos no iónicos adecuados que pueden utilizarse en la solución acuosa son, entre otros, los etoxilatos de octilfenol (por ejemplo, serie Triton X), monoestearato de sorbitán, polisorbato, poloxómero, nonoxinoles, alcohol cetílico, alquilpoliglicósido, etc. Preferiblemente, el tensioactivo no iónico son los etoxilatos de octilfenol, es decir, la serie Triton X, que incluye, entre otros, Triton X-15, Triton X-35, Triton X-45, Triton X-100, Triton X-102, Triton X-114, etc. Según algunas realizaciones de la presente divulgación, el tensioactivo no iónico es Triton X-100, y está presente en la solución acuosa en una concentración entre aproximadamente 0,1 - 10% (en peso), como 0,1, 0,2, 0,3, 0,4, 0,5, 0,6, 0,7, 0,8, 0,9, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, o 10% (en peso). Preferiblemente, el tensioactivo no iónico está presente en la solución acuosa en una

concentración entre 0,5 y 5% (en peso), como 0,5, 0,6, 0,7, 0,8, 0,9, 1, 2, 3, 4 o 5% (en peso). Según una realización preferida, la solución acuosa contiene aproximadamente un 1% (peso) de Triton X-100.

[0037] Opcionalmente, la solución acuosa puede comprender además un tensioactivo aniónico, como ácido lauril sulfónico, ácido dodecil sulfónico, ácido dodecil benceno sulfónico, ácido tridecil benceno sulfónico, ácido alquil-fenoxi benceno disulfónico, ácido naftaleno sulfónico, ácido alquil-naftaleno sulfónico y alqueniil-naftaleno. Todavía opcionalmente, la solución acuosa puede comprender además una sal, tal como cloruro de sodio, cloruro de potasio, y similares. En un ejemplo preferido, el tensioactivo aniónico es dodecil sulfato sódico (SDS).

[0038] A continuación, en el paso (3), la solución acuosa de piel animal lavada del paso (2) se digiere enzimáticamente con una proteasa. El tratamiento de digestión enzimática en el presente paso es suave para preservar la estructura nativa y la conformación de la fibra de colágeno. Ejemplos de proteasas adecuadas que pueden utilizarse en el paso (4) incluyen, pero no se limitan a, pepsina, tripsina, quimotripsina, papaína, quimopapaína, bromelaina, actinidina, proteinasa A, proteinasa K, peptidasa, ficina, calpaína, caspasa, o una combinación de las mismas. En un ejemplo, la proteasa es pepsina. En otro ejemplo, la proteasa es una mezcla de tripsina y quimiotripsina. Preferiblemente, la proteasa está presente en una concentración de aproximadamente 0,001 - 0,1% (en peso), como 0,001, 0,002, 0,003, 0,004, 0,005, 0,006, 0,007, 0,008, 0,009, 0,01, 0,02, 0,03, 0,04, 0,05, 0,06, 0,07, 0,08, 0,09, y 0,1% (wt%); más preferiblemente, aproximadamente 0,002 - 0,05% (wt), tal como 0,002, 0,003, 0,004, 0,005, 0,006, 0,007, 0,008, 0,009, 0,01, 0,02, 0,03, 0,04, y 0,05% (wt%). Según una realización preferida, la solución acuosa de piel animal lavada del paso (2) se digiere con aproximadamente 0,05% (peso) de pepsina durante aproximadamente 8-24 horas, como 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23 y 24 horas; preferentemente durante aproximadamente 12 a 20 horas, como 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 y 20 horas.

[0039] En el paso (4), el producto del paso (3) se trata con una nucleasa, que puede ser una nucleasa de ADN o una nucleasa de ARN, preferiblemente una nucleasa de ADN/ARN no específica. Según algunas realizaciones de la presente divulgación, el producto de la etapa (3) se trata con una nucleasa a 37°C durante aproximadamente 1 hora

[0040] Opcionalmente, el producto de la etapa (4) puede tratarse adicionalmente con una glucósido hidrolasa, como la alfa-galactosidasa, para eliminar cualquier fracción galactosídica residual del producto tratado con nucleasa de la etapa (3).

[0041] Opcionalmente, el producto de la etapa (4) puede tratarse de nuevo con la solución acuosa descrita anteriormente, para eliminar cualquier materia celular residual. Preferiblemente, la solución acuosa contiene un 1% de Triton X-100, y puede contener además un tensioactivo aniónico, como SDS.

[0042] En el paso subsiguiente (5), el producto del paso (4) se somete al tratamiento de un proceso de desionización, que comprende tratar la piel animal tratada con nucleasa del paso (4) con una solución de peróxido de hidrógeno durante 1 hora. Preferentemente, el peróxido de hidrógeno está presente en la solución a una concentración de aproximadamente 0,1-3% (en peso), tal como aproximadamente 0,1, 0,2, 0,3, 0,4, 0,5, 0,6, 0,7, 0,8, 0,9, 1, 1,5, 2, 2,5 o 3% (en peso). Según una realización preferida, el producto de la etapa (4) se trata con una solución de peróxido de hidrógeno al 1% durante aproximadamente 1 hora.

[0043] A continuación, en la etapa (6), el producto de la etapa (5) se somete a un proceso de eliminación química, que comprende tratar el producto desionizado de la etapa (5) con un fluido supercrítico. De forma similar a la condición descrita para la piel de los animales en la etapa (2), en la presente etapa puede utilizarse el mismo fluido supercrítico o uno diferente, a una presión de entre 10 y 50 MPa (100 y 500 bar) y a una temperatura de entre 30 y 50°C durante un periodo de entre 20 minutos y 5 días. En un ejemplo, el SCF es scCO₂. En otro ejemplo, el SCF es scN₂O. De acuerdo con una realización preferida, el SCF se aplica al producto de la etapa (5) junto con un co-disolvente, y el proceso de eliminación química se lleva a cabo en una condición en la que la temperatura es de aproximadamente 37 °C, y la presión es de aproximadamente 35 MPa (350 bar), durante unos 60 minutos. El cosolvente es etanol. En algunos ejemplos preferidos, el co-disolvente se aplica con el SCF en una proporción de volumen de 1:20 a 1:4, tal como 1:20, 1:19, 1:18, 1:17, 1:16, 1:15, 1:14, 1:13, 1:10, 1:9, 1:8, 1:7, 1:6, 1:5, y 1:4. En una realización preferida, el etanol se aplica con SCF en una proporción de volumen de 1:19. En otra realización, el etanol se aplica con SCF en una proporción de volumen de 1:10. En otra realización, el etanol se aplica con SCF en una proporción de volumen de 1:4.

[0044] En la etapa final (7), el producto de la etapa (6) se granula para producir la partícula de colágeno deseada, adecuada para su administración mediante inyección. El proceso de granulación se realiza cortando, triturando o cizallando el producto de la etapa (6) (es decir, una matriz de colágeno) en presencia de nitrógeno líquido a fin de producir la partícula de colágeno que tiene un tamaño de partícula de aproximadamente 10-250 µm, tal como aproximadamente 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95, 100, 105, 110, 115, 120, 125, 130, 135, 140, 145, 150, 155, 160, 170, 175, 180, 185, 190, 195, 200, 205, 210, 220, 225, 230, 235, 240, 245 y 250 µm. En una realización preferida, la partícula de colágeno tiene un tamaño de entre 50 y 100 µm, por ejemplo de entre 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95 y 100 µm. En otra realización, la partícula de colágeno tiene un tamaño aproximado de 100-150 µm, como por ejemplo 100, 105, 110, 115, 120, 125, 130, 135, 140, 145 y 150µm. En otra realización, la partícula de colágeno tiene un tamaño aproximado de 150-250 µm, por ejemplo de 150, 155, 160, 170, 175, 180, 185, 190, 195, 200, 205, 210, 220, 225, 230, 235, 240, 245 y 250 µm. La partícula de colágeno así producida se caracteriza por tener fibras de colágeno, en las que

se conservan las estructuras y conformaciones nativas de las fibras de colágeno, de modo que la partícula de colágeno de la presente divulgación puede servir como un bio-andamio que permite que las células crezcan en él.

[0045] La partícula de colágeno así producida puede utilizarse como relleno dérmico y se administra a un sitio deseable de un sujeto (por ejemplo, la cara) mediante el uso de una aguja de calibre 32 o menos, como 32, 30, 29, 28, 27, 26s, 26, 25, 24, 23, 22s, 22, 21, 20, 19, 18, 17, 16, 15, 14, 13, 12, 11, 10, 9, 8, o 7 calibre. En un ejemplo, la presente partícula de colágeno se inyectó con una aguja de calibre 30. En otro ejemplo, la presente partícula de colágeno se inyectó con una aguja de calibre 27.

[0046] Alternativamente, las partículas de colágeno así producidas pueden utilizarse como apósitos para heridas y se administran a la herida de un sujeto, mediante el uso de un aplicador, que pulveriza la presente solución de colágeno uniformemente sobre las heridas, que incluyen, pero no se limitan a, heridas quirúrgicas (como incisiones), úlceras y cualquier otra lesión del cuerpo en la que la piel u otro tejido esté roto, cortado, perforado o desgarrado; Líneas y/o depresiones en la piel del rostro que incluyen, entre otras, arrugas del entrecejo, arrugas alrededor de la boca, arrugas de preocupación, patas de gallo, arrugas de la sonrisa y cicatrices faciales por acné o lesiones.

[0047] El presente método difiere del método de la técnica anterior en que, no requiere el uso de un agente de reticulación o la adición de una sal para estabilizar la matriz de colágeno durante la preparación, ni requiere la extracción de fibras de colágeno de la matriz de colágeno así producida; en su lugar, toda la matriz de colágeno así producida en la presente divulgación se somete directamente a un proceso de granulación para producir partículas de colágeno deseadas, en el que cada partícula es de aproximadamente 10-250 μm de diámetro. Cada una de las partículas de colágeno producidas por el presente método está constituida por fibras de colágeno en las que se mantiene la integridad de las fibras de colágeno, por lo que las partículas de colágeno de la presente divulgación son adecuadas para su uso como andamios biológicos para que las células huésped crezcan en ellos.

[0048] La presente invención se describirá ahora más específicamente con referencia a las siguientes realizaciones, que se proporcionan con fines de demostración y no de limitación.

Material y métodos

EJEMPLOS

Cultivos celulares

[0049] Las células de fibroblastos NIH-3T3 se cultivaron en DMEM-alta glucosa con suplementos, incluidos un 10% de suero bovino fetal (FBS), 100 unidades/ml de penicilina y 100 mg/ml de estreptomicina a 37°C en una atmósfera humidificada con un 5% de CO₂.

Recelularización en las partículas de colágeno

[0050] Las células 3T3 se cultivaron hasta un 80% de confluencia y, a continuación, se recogieron mediante tratamiento enzimático (0,25% de tripsina en 1 mM de EDTA) y centrifugación a 500 x g durante 5 minutos. Las células recogidas se volvieron a suspender en medio de cultivo y se sembraron en las partículas de colágeno tratadas con SCF a una concentración de 1×10^3 células/mL; a continuación, las partículas se colocaron en una placa de cultivo de 24 pocillos y se cultivaron durante 12, 24, 48 o 72 horas en la incubadora para garantizar que las células se adherían a la superficie. A continuación, las partículas de colágeno con células 3T3 cultivadas en ellas se fijaron sumergiéndolas en glutaraldehído al 2,5% durante 1,5 horas y en tetraóxido de oxígeno al 1% durante 1,5 horas, y después se deshidrataron sumergiéndolas en alcohol.

Animales

[0051] Se utilizaron conejos blancos de Nueva Zelanda (cada uno con un peso superior a 0,5 o 2 kg) para el estudio de pirógenos y el estudio de irritación intracutánea; ratones ICR (BioLASCO Taiwan Co., Ltd., cada uno con un peso aproximado de 17-23 g) para el estudio de sensibilización cutánea, y cobayas (cada uno con un peso aproximado de 300-500 g) para el estudio de sensibilización cutánea. Los conejos (1 conejo/jaula), los ratones (5 ratones/jaula) y los cobayas (5 cobayas/jaula) se mantuvieron en el animalario con comida y agua ad libitum, la temperatura y la humedad del animalario se mantuvieron respectivamente en 18-26°C y 30-75%. La temperatura corporal de los conejos blancos de Nueva Zelanda se registró diariamente, y se seleccionaron para el estudio de pirógenos aquellos cuya temperatura corporal no superaba los 39,8°C y no había más de 1°C de diferencia entre la temperatura corporal más alta y la más baja. Todos los animales fueron sometidos a cuarentena y aclimatados antes de iniciarse cada ensayo.

EJEMPLO 1 Preparación y caracterización de las partículas de colágeno

1.1 Preparación de la matriz de colágeno

[0052] Una corteza porcina desgrasada y sin pelo de 0,2-0,4 mm se secó a 4°C durante 24 horas, después se trató con scCO_2 a 35 MPa (350 bar), 37°C durante 40 - 180 min para eliminar cualquier materia celular residual.

[0053] A continuación, la corteza porcina descelularizada se sometió a diversos tratamientos a temperatura ambiente (unos 22-28°C), como sonicación, lavado, digestión enzimática y lavado. Brevemente, la corteza porcina descelularizada fue sonicada (0,1 M Tris) durante 1 h, agitada a una velocidad de 100 rpm durante 22 h, y sonicada de nuevo durante otra hora. A continuación, se lavó la corteza porcina sonicada secuencialmente con agua (10 min/lavado, 2 lavados), una solución que contenía 1% de Triton X-100 (agitando a una velocidad de 100 rpm, 24 h) y agua (10 min cada lavado, total de 2 lavados), para eliminar cualquier impureza y producir una matriz de colágeno. A continuación, la matriz de colágeno se trató con una solución de pepsina (0,01% de pepsina en ácido acético 0,5M) durante 1 hora, seguida de un lavado con agua (10 min/lavado, 2 lavados) mientras se agitaba a una velocidad de 100 rpm.

[0054] A continuación, la matriz de colágeno se trató con una solución de ADNasa (0,3U/cm²) a 37°C durante 1 h, después se lavó con Triton X-100 al 1% (agitando a una velocidad de 100 rpm durante 24 h), y agua (10 min/lavado, 2 lavados) a temperatura ambiente (aproximadamente 22-28°C). A continuación, la matriz de colágeno se colocó en una solución de H_2O_2 al 1% y se sometió a agitación a una velocidad de 65 rpm durante 1 h, se lavó con agua (10 min/lavado, 2 lavados) a temperatura ambiente (unos 22-28°C), y se secó al vacío a 37°C durante unos 8-30 min. A continuación, se trató de nuevo con scCO_2 a 35MPa (350 bar), 37°C durante 60 min en presencia de etanol al 10% (vol%); después se rehidrató en agua a 25°C durante 10 min, y se secó al vacío a 37°C durante unos 8-30 min.

1.2 Producción de partículas de colágeno

[0055] La matriz de colágeno rehidratada del ejemplo 1.1 se cortó en rodajas y se molió en partículas utilizando Freezer/Mill (6770/6870, 5-25 ciclos). Las partículas de colágeno así producidas se irradiaron con rayos gamma (10-50 kGy) y se almacenaron esterilizadas hasta su uso.

[0056] El análisis por electromicroscopía (EM) indicó que cada una de las partículas de colágeno así producidas poseía una estructura fibrilar relativamente intacta (**FIG. 1**).

1.3 Las partes de colágeno del ejemplo 1.2 favorecen el crecimiento de las células 3T3

[0057] Las partículas de colágeno del ejemplo 1.2 se recelularizaron de acuerdo con los procedimientos descritos en la sección "Materiales y métodos". La porosidad de las partículas de colágeno del ejemplo 1.2 sirvió como un excelente andamio biológico para soportar el crecimiento de las células 3T3 recién sembradas (**FIG 2**, panel A), toda la partícula se convirtió con células 3T3 después de ser cultivada durante 72 hrs (**FIG 2**, panel B).

Ejemplo 2 Pruebas de alergia a las partículas de colágeno del ejemplo 1

[0058] Para evaluar el riesgo potencial de que las presentes partículas de colágeno provoquen alguna reacción alérgica a sus huéspedes, se produjo un extracto de colágeno a partir de la matriz de colágeno del ejemplo 1.1 y, a continuación, se utilizó en diversas pruebas alérgicas, incluido el estudio de pirógenos, el estudio de sensibilización cutánea, el estudio de inyección aguda en el sistema y el estudio de irritación intracutánea de conformidad con los procedimientos aprobados pertinentes, en particular, la norma ISO 10993-10, 11, .

2.1 Preparación del extracto de colágeno

[0059] La matriz de colágeno del ejemplo 1.1 (3 x 4 cm) se sumergió en solución salina al 0,9% o en aceite de semilla de algodón a 50°C durante 72 horas con agitación constante (150 rpm) para producir el extracto de colágeno en solución salina o el extracto de colágeno en aceite de semilla de algodón. La relación de superficie de la matriz de colágeno/0,9% de solución salina o aceite de semilla de algodón era de aproximadamente 1 cm²/1 mL.

2.2 Estudio de pirógenos

[0060] El estudio de pirógenos se realizó de acuerdo con los protocolos establecidos en el Formulario Nacional de la Farmacopea de EE.UU. USP36/NF31(151). Brevemente, se utilizaron 6 conejos blancos de Nueva Zelanda machos (>1,5 Kg, 3 conejos en el grupo de control y 3 conejos en el grupo de prueba) en este estudio, y se inyectaron 10mL/Kg del extracto de colágeno en solución salina del ejemplo 2.1 en la vena de la oreja de cada conejo. Los conejos del grupo de control recibieron sólo la inyección de solución salina al 0,9%. La administración se completó en 10 minutos. Las temperaturas corporales de los conejos de prueba se midieron respectivamente 1, 1,5, 2, 2,5 y 3 horas después de la administración del extracto de colágeno.

[0061] Las temperaturas corporales de los conejos de control fueron de 39,1, 38,8 y 38,8°C, respectivamente (Tabla 1), mientras que se observaron ligeras fluctuaciones en las temperaturas corporales de los conejos de prueba tras la administración del extracto de colágeno en solución salina; sin embargo, las fluctuaciones se consideraron aún dentro del rango aceptable (Tabla 2), lo que indica que el extracto de colágeno derivado de la matriz de colágeno del ejemplo 1 estaba libre de pirógenos.

Tabla 1. Temperatura corporal de los conejos de prueba antes de la administración del extracto de colágeno

Número de animal	Temperatura corporal antes de la administración ()°C		Controlar Temperatura
	1 st	2 nd	
# 1	39.1	39.1	39.1
# 2	38.6	38.8	38.8
# 3	38.8	38.8	38.8

Tabla 2. Temperatura corporal de los conejos de prueba tras la administración del extracto de colágeno

Número de animal	Temperatura corporal (°C) medida a la hora designada tras la administración					HBT-CT ()°C
	1 hora	1,5 h	2 horas	2,5 horas	3 horas	
# 1	39.1	38.8	38.7	38.7	38.7	0
# 2	38.5	38.5	38.6	38.4	38.4	-0.2
# 3	39.1	38.9	38.8	38.6	38.8	0.3
HBT: la temperatura corporal más alta CT: la temperatura de control de los animales de ensayo del cuadro 1						

2.3 Estudio de sensibilización cutánea

[0062] El estudio de sensibilización cutánea se llevó a cabo de acuerdo con los protocolos establecidos en la norma ISO 10993-10. Se asignó aleatoriamente un total de 30 cobayas macho a 4 grupos, a saber, el grupo de control-1 (N=5), el grupo de control-2 (N=5), el grupo de tratamiento-1 (N=10) y el grupo de tratamiento-2 (N=10). Antes del estudio, se recortaron las pieles del lomo de los animales de prueba desde el cuello hasta la zona escapular con una afeitadora electrónica, se crearon 3 zonas recortadas designadas respectivamente como A, B y C en el lado izquierdo de cada animal, y 3 zonas recortadas designadas respectivamente como A, B y C también se crearon en el lado derecho de manera similar, siendo cada zona de unos 2 x 2 cm² de tamaño.

[0063] El día 1 del tratamiento, los animales de cada grupo recibieron una inyección intradérmica de 0,1 mL de las respectivas soluciones indicadas en las Tablas 3 o 4 para el "periodo de introducción (I)" en las respectivas zonas recortadas. Una semana más tarde, se aplicó dodecil sulfato sódico (SDS) al 10% en las zonas de inyección si los animales no mostraban ninguna reacción de irritación; a continuación, las mismas zonas de inyección se cubrieron con parches previamente impregnados con 0,2 mL de la solución indicada para el "periodo de introducción (II)" en las Tablas 3 ó 4. Dos semanas después de los tratamientos en el "período de introducción (II)", se recortaron las pieles de la parte inferior del lomo de los animales desde la zona escapular hasta la cadera, y se seleccionó un lugar apropiado de esta zona sin pelo y se cubrió con un parche previamente empapado con 0,1 mL de la solución indicada en las Tablas 3 ó 4 para el "período de desafío".

Tabla 3.

Solución de tratamiento				
Periodos de prueba	de	Grupo de tratamiento 1 (10 animales)		Grupo de control-1 (5 animales)
Inducción (I)	Zona A	una emulsión de solución salina al 0,9% y FCA en proporción de volumen 1:1		Zona A una emulsión de solución salina al 0,9% y FCA en proporción de volumen 1:1
	二、	三、 el extracto de colágeno	四、	五、 Solución salina al 0,9%.
	C	una emulsión del extracto de colágeno y E-FCA en proporción 1:1 en volumen	C	una emulsión de solución salina al 0,9% y FCA en proporción de volumen 1:1
Inducción (II)	A, B, C	el extracto de colágeno	A, B, C	六、 Solución salina al 0,9%.
Desafío	A, B, C	el extracto de colágeno	A, B, C	Solución salina al 0,9%.

FCA: adyuvante completo de Freund

Tabla 4.

Solución de tratamiento				
Periodos de prueba	de	Grupo de tratamiento 2 (10 animales)		Grupo de control-2 (5 animales)
Inducción (I)	Zona A	una emulsión de aceite de semilla de algodón y FCA en proporción 1:1 en volumen	Zona A	una emulsión de aceite de semilla de algodón y FCA en proporción 1:1 en volumen
	B	七、 九、 el extracto de colágeno del aceite de semilla de algodón	B	八、 Aceite de algodón
	C	una emulsión del extracto de colágeno y FCA en proporción de volumen 1:1	C	una emulsión de aceite de semilla de algodón y FCA en proporción 1:1 en volumen
Inducción (II)	A, B, C	el extracto de colágeno del aceite de semilla de algodón	A, B, C	Aceite de algodón
Desafío	A, B, C	el extracto de colágeno del aceite de semilla de algodón	A, B, C	Aceite de algodón

[0064] La piel de la zona recortada se observó 24 y 48 horas después de la prueba para ver si alguna de las zonas desarrollaba irritación y/o respuesta alérgica. Los resultados indicaron que ni los animales del grupo de control ni los del grupo de tratamiento mostraron signos visibles de irritación en las zonas de prueba. Así pues, el extracto de colágeno de la presente invención no causó hipersensibilidad retardada en la piel de los cobayas de prueba.

2.4 Estudio de irritación intracutánea

[0065] Este estudio de irritación se realizó de acuerdo con los protocolos establecidos en la norma ISO 10993-10. Brevemente, en este estudio se utilizaron 6 conejos blancos de Nueva Zelanda machos (>2 Kg, 3 conejos en el grupo de control y 3 conejos en el grupo de prueba). Antes del estudio, se recortaron las pieles del lomo de los animales de prueba con una afeitadora electrónica. El día del tratamiento, se inyectaron aproximadamente 0,2 ml del extracto de colágeno en solución salina del ejemplo 2.1 en 5 puntos del lado izquierdo de cada conejo; y aproximadamente 0,2 ml del extracto de colágeno en aceite de semilla de algodón del ejemplo 2.1 en otros 5 puntos del lado derecho de cada conejo. Los conejos del grupo de control recibieron 0,2 mL de las inyecciones de solución salina al 0,9% o de aceite de semilla de algodón en

los mismos sitios. Los animales fueron sometidos a observación a las 24, 48 y 72 horas después de la administración, para ver si se producía alguna reacción dérmica en los puntos de tratamiento.

[0066] No se encontraron signos clínicos significativos de irritación intracutánea ni en los animales de control ni en los de tratamiento, ni tampoco mortabilidad. Así pues, una sola aplicación tópica del extracto de colágeno no causó irritación intracutánea en conejos blancos de Nueva Zelanda.

2.5 Estudio de inyección aguda en el sistema

[0067] Este estudio de inyección aguda en el sistema se llevó a cabo de acuerdo con los protocolos establecidos en la norma ISO 10993-11. Un total de 20 cobayas macho fueron asignados aleatoriamente a 4 grupos, es decir, los grupos control-1 (N=5), control-2 (N=5), tratamiento-1 (N=5) y tratamiento-2 (N=5).

[0068] El día 1 del tratamiento, los animales del grupo control-1 recibieron una inyección intravenosa de dosis única del extracto de colágeno en solución salina (50mL/Kg), mientras que los animales del grupo control-2 recibieron una inyección intraperitoneal de dosis única del extracto de colágeno en aceite de semilla de algodón (50mL/Kg). Los animales de los grupos control-1 y control-2 recibieron inyecciones de solución salina al 0,9% y aceite de semilla de algodón, respectivamente. A continuación, los ratones fueron sometidos a una observación de toxicidad a las 4, 24, 48 y 72 horas de la administración, respectivamente.

[0069] No se encontraron signos clínicos significativos de toxicidad ni en los animales de control ni en los de tratamiento, ni tampoco mortabilidad. Así pues, una sola aplicación del extracto de colágeno no provocó reacciones de toxicidad en los animales de prueba.

REIVINDICACIONES

1. Un método para preparar una partícula de colágeno que comprende:

(1) someter a un proceso de descelularización una piel animal de un grosor aproximado de 0,1-1 mm;
 (2) someter la piel animal descelularizada de la etapa (1) al tratamiento de una solución acuosa que contenga un tensioactivo no iónico;
 (3) someter la piel animal tratada con solución acuosa de la etapa (2) al tratamiento de una proteasa;
 (4) someter la piel animal tratada con proteasa de la etapa (3) al tratamiento de una nucleasa;
 (5) someter la piel animal tratada con nucleasas de la etapa (4) a un proceso de desionización;
 (6) someter la piel animal desionizada de la etapa (5) a un proceso de eliminación química para producir una matriz de colágeno; y
 (7) someter la matriz de colágeno de la etapa (6) a un proceso de granulación para producir la partícula de colágeno que tiene un tamaño de aproximadamente 10-250 μm ,
 en el que en el paso (1), la piel animal que tiene un espesor de aproximadamente 0,1-1 mm se somete al tratamiento de un fluido supercrítico (SCF) bajo una presión de aproximadamente 10 - 50 MPa (100 - 500 bar) a una temperatura entre 30-50° C durante aproximadamente 20 min a 5 días y el SCF es un dióxido de carbono supercrítico (scCO_2) o un óxido nitroso supercrítico (scN_2O);
 en el que el tensioactivo no iónico de la solución acuosa de la etapa (2) se selecciona del grupo que consiste en etoxilatos de octilfenol, monoestearato de sorbitán, polisorbato, poloxómero, nonoxinoles, alcohol cetílico y alquilpoliglucósido;
 en la que la proteasa de la etapa (3) es cualquiera de las siguientes: pepsina, tripsina, quimotripsina, papaína, quimopapaína, bromelaína, actinidaina, proteinasa A, proteinasa K, peptidasa, ficina, calpaína, caspasa o una combinación de las mismas;
 en la que la nucleasa de la etapa (4) es una nucleasa de ADN o una nucleasa de ARN;
 en el que el proceso de desionización del paso (5) comprende tratar la piel animal tratada con nucleasa del paso (4) con una solución de peróxido de hidrógeno durante una hora;
 en la que en la etapa (6) la piel animal desionizada de la etapa (5) se somete al tratamiento de un fluido supercrítico (SCF) a una presión de aproximadamente 10 - 50 MPa (100 - 500 bar) a una temperatura entre 30-50°C durante unos 20 minutos a 5 días para eliminar los productos químicos residuales del mismo, y el SCF es un dióxido de carbono supercrítico (scCO_2) o un óxido nitroso supercrítico (scN_2O), y el SCF se aplica a la piel animal desionizada de la etapa (5) junto con un cosolvente que es etanol, donde "aproximadamente" significa con un 10% de un rango dado.

2. El método según la reivindicación 1, en el que en el paso (1), la temperatura es de aproximadamente 37°C, y la presión es de aproximadamente 35 MPa (350 bar), en el que "aproximadamente" significa con un 10% de un valor dado.

3. El método según la reivindicación 1, en el que la solución acuosa del paso (2) comprende además un tensioactivo aniónico, que se selecciona del grupo que consiste en ácido lauril sulfónico, ácido dodecil sulfónico, dodecil sulfato sódico (SDS), ácido dodecil benceno sulfónico, ácido tridecil benceno sulfónico, ácido alquil-fenoxi benceno disulfónico, ácido naftaleno sulfónico, ácido alquil-naftaleno sulfónico y alquienil-naftaleno.

4. El método según la reivindicación 1, en el que la solución acuosa de la etapa (2) comprende además una sal.

5. El método según la reivindicación 1, en el que el producto de la etapa (4) se trata además con la solución acuosa de la etapa (2).

6. El método según la reivindicación 5, en el que el tensioactivo no iónico de la solución acuosa del paso (2) se selecciona del grupo que consiste en, etoxilatos de octilfenol, monoestearato de sorbitán, polisorbato, poloxómero, nonoxinoles, alcohol cetílico y alquilpoliglucósido.

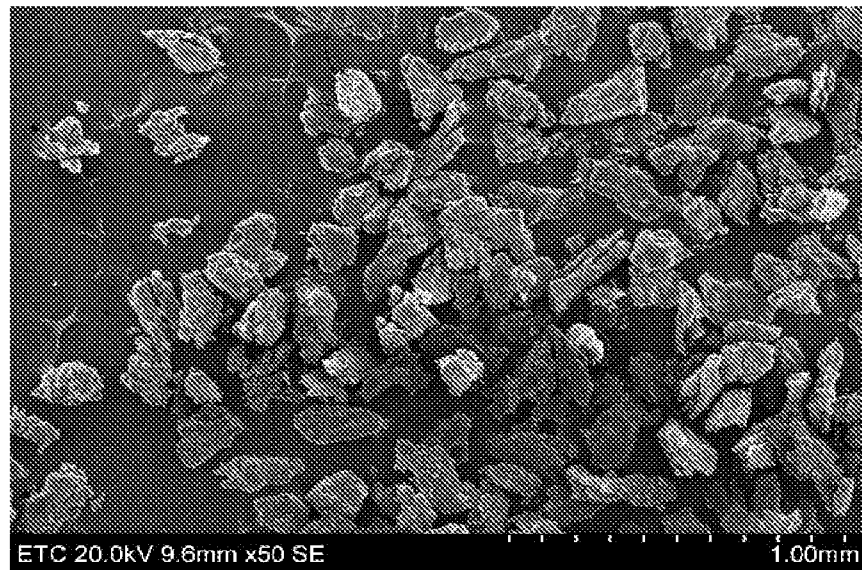
7. El método según la reivindicación 6, en el que la solución acuosa comprende además un tensioactivo aniónico, que se selecciona del grupo que consiste en ácido lauril sulfónico, ácido dodecil sulfónico, dodecil sulfato sódico (SDS), ácido dodecil benceno sulfónico, ácido tridecil benceno sulfónico, ácido alquil-fenoxi benceno disulfónico, ácido naftaleno sulfónico, ácido alquil-naftaleno sulfónico y alquienil-naftaleno.

8. El método según la reivindicación 7, en el que la solución acuosa comprende además una sal.

9. El método según la reivindicación 1, en el que en el paso (6), la temperatura es de aproximadamente 37°C, y la presión es de aproximadamente 35 MPa (350 bar), en el que "aproximadamente" significa un 10% dentro de un rango dado.

10. El método según la reivindicación 1, en el que el proceso de granulación del paso (7) se realiza cortando o triturando la matriz de colágeno del paso (6) en presencia de nitrógeno para producir la partícula de colágeno que tiene un tamaño de aproximadamente 10-250 μm , en el que "aproximadamente" significa con un 10% de un rango dado.

(A)



(B)

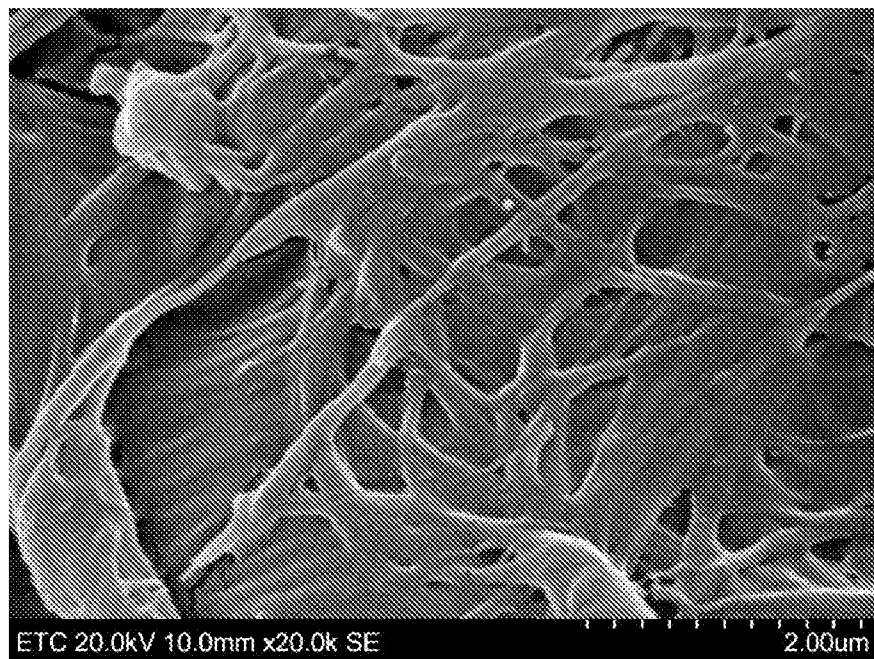
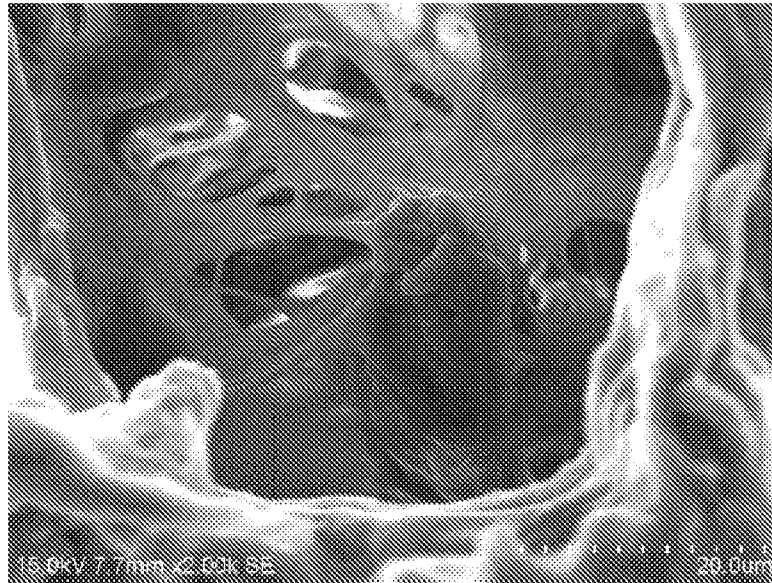


FIG 1

(A)



(B)

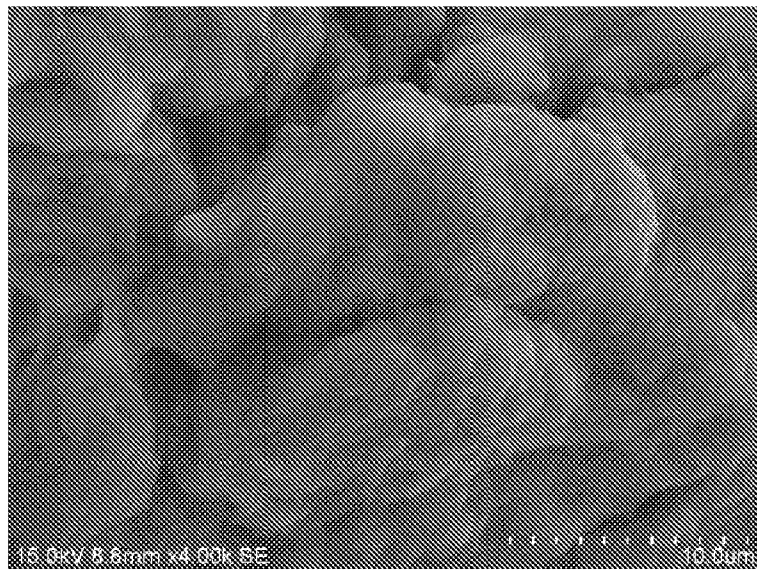


FIG 2