(19) OFICINA ESPAÑOLA DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

(11) Número de publicación: **2 842 501**

(51) Int. CI.:

D06N 3/00 (2006.01)
C12N 5/00 (2006.01)
C14C 13/00 (2006.01)

(12) TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA T3

(86) Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **21.09.2016 PCT/US2016/052891**

(87) Fecha y número de publicación internacional: **30.03.2017 WO17053433**

(96) Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **21.09.2016 E 16849509 (1)**

(97) Fecha y número de publicación de la concesión europea: **28.10.2020 EP 3337923**

(54) Título: **Materiales compuestos de tejido reforzados con fibras**

(30) Prioridad:

21.09.2015 US 201562221521 P

(45) Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
14.07.2021

(73) Titular/es:

MODERN MEADOW, INC. (100.0%)
111 Ideation Way, Suite 100
Nutley, New Jersey 07110, US

(72) Inventor/es:

PURCELL, BRENDAN PATRICK y
FORGACS, GABOR

(74) Agente/Representante:

LINAGE GONZÁLEZ, Rafael

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

Materiales compuestos de tejido reforzados con fibras

Antecedentes

El cuero se usa en una amplia variedad de aplicaciones, incluyendo tapicería de muebles, ropa, zapatos, equipaje, bolsos y accesorios, y aplicaciones en automoción. Actualmente, se usan pieles de animales como materia prima para el cuero natural. Sin embargo, las pieles del ganado plantean preocupaciones medioambientales porque la cría de ganado requiere enormes cantidades de alimento, pastos, agua y combustible fósil. El ganado también produce una contaminación significativa para el aire y las vías fluviales. Además, el uso de pieles de animales para producir cuero es objetable para las personas con conciencia social. La industria mundial del cuero sacrifica más de mil millones de animales al año. La mayor parte del cuero procede de países sin leyes de bienestar animal o que tienen leyes que no se aplican en gran medida o en su totalidad. El cuero producido sin matar animales sería una gran novedad y tendría atractivo en la moda.

Aunque el cuero sintético se desarrolló para abordar algunas de estas preocupaciones, carece de la calidad, la durabilidad y el prestigio del cuero natural. Hasta ahora, no se han desarrollado procedimientos científicamente sólidos e industrialmente viables para producir cuero natural. Por consiguiente, existe la necesidad de una solución a las demandas de alternativas al cuero producido a partir de animales vivos.

El cuero natural normalmente es un material duradero y flexible creado mediante la curtición de cuero crudo y piel de animales, a menudo pellejo de ganado. Generalmente se entiende que la curtición es el procedimiento de tratar las pieles de animales para producir cuero. La curtición puede realizarse de varios modos bien conocidos, incluyendo curtición vegetal (por ejemplo, usando tanino), curtición al cromo (sales de cromo, incluyendo sulfato de cromo), curtición con aldehído (usando compuestos de oxazolidina o glutaraldehído), sintanos (taninos sintéticos, usando polímeros aromáticos) y similares.

El cuero natural normalmente se prepara en tres partes principales: fases preparatorias, curtición y formación de cuero semiterminado. También puede incluirse el recubrimiento de superficie. Las etapas preparatorias preparan el pellejo/piel para la curtición, y se retiran los componentes no deseados de la piel sin procesar. Las fases preparatorias pueden incluir: conservación, remojo (rehidratación), calero, pelambre, descarnado (retirada de material subcutáneo), dividido, nuevo calero, desencalado (para retirar los productos químicos del pelambre y el encalado), rendido (proteólisis de proteínas), desengrase, frisado, blanqueo, piquelado (cambio de pH), remoción del ácido y la sal (*de-pickling*), etc.

La curtición se realiza para convertir las proteínas en el pellejo/la piel en un material estable que no se pudrirá, al tiempo que permite que el material permanezca flexible. El cromo es el material de curtición usado más frecuentemente. El pH de la piel/el pellejo puede ajustarse (por ejemplo, reducirse, por ejemplo hasta pH 2,8-3,2) para mejorar la curtición; después de la curtición, el pH puede elevarse (“basificación” hasta un nivel ligeramente superior, por ejemplo, pH 3,8-4,2).

La formación de cuero semiterminado se refiere al tratamiento tras la curtición que puede incluir dar color (teñir), adelgazar, secar o hidratar y similares. Los ejemplos de técnicas de formación de cuero semiterminado incluyen: humectación (rehidratación), abrevado (secado), división (en capas más delgadas), afeitado, neutralización (ajuste del pH a un nivel más neutro), recurtición, teñido, engrasado, llenado, rellenado, pelado, blanqueo, fijación de productos químicos no unidos, endurecimiento, acondicionamiento, ablandamiento, pulido, etc.

En la práctica, el procedimiento de conversión de la piel de animal en cuero puede incluir etapas secuenciales tales como: depilado/pelambre, calero, desencalado y rendido, piquelado, curtición, neutralización/teñido y engrasado, secado y acabado. El proceso de pelambre puede retirar químicamente el pelo (por ejemplo, usando una disolución alcalina), mientras que la etapa de calero (por ejemplo, usando una disolución alcalina y de sulfuro) puede completar adicionalmente el proceso de retirada de pelo e hinchar (“abrir”) el colágeno. Durante la curtición, la estructura de la piel puede estabilizarse en la forma “abierta” reemplazando parte del colágeno con iones complejos de cromo. Dependiendo de los compuestos usados, el color y la textura del cuero pueden cambiar. El cuero curtido puede ser mucho más flexible que un pellejo sin tratar y también más duradero.

La piel, o el pellejo de animal, está formada principalmente por colágeno, una proteína fibrosa. El colágeno es un término genérico para una familia de al menos 28 tipos distintos de colágeno; la piel de animal normalmente es colágeno tipo 1 (por lo que se supone normalmente que el término colágeno es colágeno tipo 1), aunque pueden usarse otros tipos de colágeno para la formación del cuero. Los colágenos se caracterizan por un triplete de repetición de aminoácidos, - $(Gly\text{-}X\text{-}Y)_n$-, de modo que aproximadamente un tercio de los residuos de aminoácido que se encuentran en el colágeno son glicina. X es a menudo prolina e Y es a menudo hidroxiprolina. Por tanto, la estructura del colágeno puede consistir en unidades triples entrelazadas de cadenas peptídicas de diferentes longitudes. Diferentes animales pueden producir diferentes composiciones de aminoácidos del colágeno, lo que puede dar como resultado diferentes propiedades (y diferencias en el cuero resultante). Los monómeros de fibra de

colágeno pueden producirse a partir de cadenas alfa de aproximadamente 1050 aminoácidos de longitud, de modo que la triple hélice adopta la forma de una varilla de aproximadamente 300 nm de longitud, con un diámetro de 1,5 nm. En la producción de la matriz extracelular por las células de la piel fibroblastos, pueden sintetizarse monómeros de triple hélice y los monómeros pueden unirse entre sí para dar lugar a una forma fibrosa. Estas triples hélices pueden mantenerse juntas mediante enlaces salinos, enlaces de hidrógeno, enlaces hidrófobos y enlaces covalentes. Las triples hélices pueden unirse entre sí en haces denominados fibrillas y los haces de fibrillas se unen entre sí para crear fibras. Las fibras normalmente se dividen y se unen entre sí a lo largo de una capa de piel. Las variaciones de la reticulación o la unión pueden proporcionar resistencia al material. Las fibras pueden tener una variedad de diámetros. Además del colágeno tipo I, la piel (pellejos) también puede incluir otros tipos de colágeno, incluyendo el colágeno tipo III (reticulina), el colágeno tipo IV y el colágeno tipo VII.

Los intentos anteriores de obtención de cueros obtenidos mediante ingeniería han resultado insatisfactorios o poco prácticos. Por ejemplo, el documento EP 1589098 ("la solicitud '098") describe un método de hacer crecer fibroblastos sembrados en soportes bioactivos tridimensionales. Los soportes pueden estar compuestos por material de desecho de colágeno procedente de un procedimiento de curtición ("división"), micropartículas de colágeno puro, partículas de material de desecho de colágeno o soportes sintéticos (por ejemplo, compuestos por polímeros tales como HYAFF). La adición del material de soporte complica y aumenta el coste de su procedimiento propuesto y también afecta a las propiedades de cualquier cuero producido de este modo.

La solicitud '098 es un ejemplo de una técnica de soporte para cultivar cuero, sin embargo, un método como este, que usa un soporte de materiales de colágeno obtenido mediante ingeniería o de desecho, no se ha usado ampliamente porque es costoso y difícil de trabajar, y ha demostrado ser técnicamente difícil de trabajar y comercializar.

En el presente documento se describen cueros obtenidos mediante ingeniería que pueden abordar los problemas mediante la formación de materiales similares a los materiales compuestos reforzados con fibras (FRC), en los que las células se cultivan sobre soportes fibrosos (formados por fibras tales como seda). En general, los FRC se refieren a materiales compuestos de construcción que forman una clase de materiales de alto rendimiento usados en varias industrias, incluyendo de la energía, la construcción, la automoción y el deporte. Los FRC consisten en una fase de matriz continua (normalmente una matriz de polímero), una fase de fibra dispersa (normalmente una fibra de vidrio, carbono o celulósica más fuerte) y una superficie de contacto entre la matriz y las fibras. Dentro de la superficie de contacto, las fibras se adhieren a la fase de matriz a través de interacciones covalentes o no covalentes para una transmisión de fuerza eficaz desde la fase de matriz a las fibras. Como resultado, pueden realizarse materiales con resistencias increíbles que no son posibles con cada material individualmente.

Tal como se ha mencionado, se han desarrollado numerosos soportes obtenidos mediante ingeniería de tejido a lo largo de los últimos 25 años para construir tejidos biológicos con estructuras y dimensiones definidas. Estos soportes proporcionan un área superficial para que las células se adhieran y hagan crecer tejido en tres dimensiones. Los materiales fibrosos que consisten en fibras entrelazadas o tejidas, de 100 nm a 100 um de diámetro, se han explorado ampliamente como soportes obtenidos mediante ingeniería de tejido debido a sus grandes áreas superficiales para el crecimiento celular por unidad de volumen y altas porosidades para permitir la infiltración celular en toda la arquitectura del soporte 3D. Normalmente, los soportes obtenidos mediante ingeniería de tejido son biodegradables, lo que permite que el tejido reemplace al soporte a medida que crece. Por tanto, el producto final consiste solo en tejido biológico para mejorar la biocompatibilidad tras la implantación.

Las construcciones obtenidas mediante ingeniería de tejido generalmente se hacen crecer para aplicaciones biomédicas, incluyendo la inserción en un cuerpo para reparar y/o reemplazar tejido biológico, por lo que la biocompatibilidad ha sido una consideración importante. Sin embargo, el uso de tejidos biológicos para aplicaciones de bienes de consumo requiere un conjunto de consideraciones muy diferente. En tales casos, debe considerarse la durabilidad, el aspecto y la capacidad para curtirse o conservarse. En el presente documento se describen métodos y técnicas para la fabricación de tejido biológico, así como el material obtenido mediante ingeniería resultante, que pueden abordar las preocupaciones descritas anteriormente. En particular, en el presente documento se describen materiales compuestos en los que el tejido se hace crecer a lo largo de un soporte fibroso y se reticula con el soporte durante un procedimiento análogo a la curtición para crear una clase novedosa de materiales compuestos de alto rendimiento, así como métodos para formar tales materiales compuestos. Estos cueros obtenidos mediante ingeniería pueden reproducir muchas de las estructuras y propiedades de los cueros naturales, pero pueden procesarse de una manera mucho más sencilla.

Sumario de la divulgación

En general, en el presente documento se describen materiales de cuero reforzados, obtenidos mediante ingeniería (cueros obtenidos mediante ingeniería) que incluyen un material compuesto de un soporte fibroso y una red de colágeno formada por células cultivadas (por ejemplo, fibroblastos). Estos materiales compuestos se curten para estabilizar la red de colágeno y las interacciones entre el soporte fibroso y la red de colágeno. Estos cueros obtenidos mediante ingeniería pueden denominarse materiales compuestos de tejido biológico reforzados con fibras. En el presente documento también se describen métodos de obtención de tales materiales compuestos de tejido

biológico reforzados con fibras.

Por ejemplo, un método de formación de un material compuesto de tejido biológico reforzado con fibras puede formarse cultivando células productoras de tejido (por ejemplo, fibroblastos) sobre un soporte fibroso que tiene un grupo funcional seleccionado del grupo que consiste en amina (-NH2), ácido carboxílico (-COOH), sulfhidrilo (-SH) e hidroxilo (-OH), y combinaciones de los mismos, que pueden reticularse (por ejemplo, mediante curtición) con el tejido y/o las proteínas, tales como colágeno, formarse y/o secretarse por las células y luego la curtición (por ejemplo, reticulación química). La curtición puede realizarse una vez que las fibras del soporte se han cubierto al menos parcialmente con las células cultivadas y la matriz extracelular liberada por las células cultivadas.

En general, puesto que están destinados a usarse como parte de un material textil, cualquiera de los materiales de soporte descritos en el presente documento pueden ser no biodegradables, al menos durante el plazo inmediato (por ejemplo, en el plazo de 1 año, 2 años, 5 años, 10 años, etc.) de uso habitual.

Tal como se describirá en mayor detalle a continuación, la densidad del tejido (por ejemplo, las células y el material extracelular depositado por las células, en particular colágeno) sobre el sustrato, debe ser mayor que un umbral mínimo con el fin de que el material resultante (denominado de manera equivalente en el presente documento cuero artificial, cuero sintético o cuero cultivado) sea mayor de aproximadamente 200.000 células/cm^2 de área superficial de sustrato inmediatamente antes de curtir el material usando cualquiera de las etapas de curtición modificada (por ejemplo, reticulación) descritas en el presente documento. Por ejemplo, la densidad de las células puede ser de entre aproximadamente 200.000 y aproximadamente 4.500.000 células/cm^2, o desde aproximadamente 250.000 hasta aproximadamente 4.000.000 células/cm^2, o desde aproximadamente 500.000 hasta aproximadamente 2.000.000 células/cm^2 de área superficial de sustrato (por ejemplo, entre un límite superior y uno inferior donde el límite inferior es de 200.000 células/cm^2, 250.000 célula/cm^2, 300.000 células/cm^2, 400.000 células/cm^2, 500.000 célula/cm^2, etc. de área superficial de sustrato y el límite superior es de 1.000.000 células/cm^2, 1.500.000 células/cm^2, 2.000.000 células/cm^2, 3.000.000 células/cm^2, 4.000.000 células/cm^2, 5.000.000 células/cm^2, 6.000.000 células/cm^2, etc., de área superficial de sustrato, donde el límite superior siempre es mayor que el límite inferior). Si la densidad es demasiado baja o demasiado alta, el cuero no tendrá la calidad/resistencia a la tracción deseada. Una vez procesado mediante reticulación (curtición) y/o lubricación/engrasado, el material puede comprender soportes fibrosos curtidos que comprenden una pluralidad de fibras, en los que las fibras están rodeadas por matriz extracelular reticulada con la pluralidad de fibras a una densidad mayor de un mínimo que es, por ejemplo, 0,01 μm o mayor (por ejemplo, 0,02 μm o mayor, 0,03 μm o mayor, 0,04 μm o mayor, 0,05 μm o mayor, 0,06 μm o mayor, 0,07μm o mayor, 0,08 μm o mayor, 0,09 μm o mayor, 0,1 μm o mayor, 0,2 μm o mayor, 0,3 μm o mayor, 0,4 μm o mayor, 0,5 μm o mayor, 0,6 μm o mayor, 0,7 μm o mayor, 0,8 μm o mayor, 0,9 μm o mayor, 1 μm o mayor, 2 μm o mayor, 3 μm o mayor, 4 μm o mayor, 5 μm o mayor, 6 μm o mayor, 7 μm o mayor, 8 μm o mayor, 9 μm o mayor, 10 μm o mayor, etc., incluyendo entre 0,01 μm y 200 μm, etc.), en el que hay buena adhesión entre la matriz extracelular y la pluralidad de fibras, de modo que la resistencia a la tracción del material compuesto de tejido biológico reforzado con fibras es mayor de aproximadamente 1,0 MPa. En general, estos materiales (cueros artificiales) pueden curtirse y pueden tener un contenido en agua que es menor del 30%, menor de aproximadamente el 25%, menor de aproximadamente el 20%, menor de aproximadamente el 18%, menor de aproximadamente el 15%, menor de aproximadamente el 12%, menor de aproximadamente el 10%, menor de aproximadamente el 7%, menor de aproximadamente el 5%, etc. Por tanto, el material compuesto de tejido biológico reforzado con fibras puede deshidratarse.

Aunque la cantidad de agua en el cultivo inicial es mayor del 95%, esta agua debe retirarse para formar el material compuesto (por ejemplo, cuero artificial, cuero cultivado, o cueros sintéticos descritos en el presente documento). El procedimiento de curtición (reticulación) descrito en el presente documento normalmente incluye una etapa de deshidratación/secado que retira la mayoría del agua, de modo que la cantidad final de agua que queda en el material compuesto resultante es de entre aproximadamente el 1% y aproximadamente el 10% (por ejemplo, desde aproximadamente el 2% hasta aproximadamente el 8%, o desde aproximadamente el 3% hasta aproximadamente el 7%, etc.) en peso. Si el contenido en agua es demasiado bajo, el material resultante (cuero) será frágil. Si el contenido en agua es demasiado alto, el material resultante (cuero) puede ser susceptible de crecimiento microbiano. Además, el material resultante puede procesarse adicionalmente para aplicar un material lubricante (por ejemplo, mediante la adición y/o la impregnación con un material hidrófobo (tal como aceites, incluyendo aceites sulfonados, cera, grasa, etc.) tal como puede producirse mediante un procedimiento de engrasado modificado. En cualquiera de los métodos descritos en el presente documento puede realizarse una etapa de acabo de impregnación del material (incluyendo remojo, recubrimiento, etc. con o sin una etapa de calentamiento y/o pH). El material hidrófobo (incluyendo uno o más de aceite, cera, grasa, etc.) pueden incluirse en el producto final en una cantidad que es de aproximadamente el 0,001% y aproximadamente el 15% (tal como igual a o entre aproximadamente el 0,1% y aproximadamente el 12%, por ejemplo, teniendo un límite inferior del 0,001%, el 0,01%, el 0,1%, el 0,5%, el 1%, el 2%, el 3%, etc. y un límite superior del 15%, el 14%, el 13%, el 12%, el 11%, el 10%, el 9%, el 8%, etc., donde el límite inferior siempre es menor que el límite superior) en peso. Por ejemplo, cualquiera de los materiales formados tal como se describe en el presente documento puede incluir entre aproximadamente el 0,1% y aproximadamente el 12% de un material hidrófobo (tal como uno o más de un aceite, grasa, cera, etc.).

En general, los soportes descritos en el presente documento son soportes fibrosos formados por cualquier material (incluyendo cualquier material reticulable) que sea propicio para el crecimiento celular y la formación de tejido de colágeno, pero en particular materiales proteicos (por ejemplo, que contienen grupos amina, ácido carboxílico, sulfhidrilo e hidroxilo), tales como la seda, con el fin de promover o estabilizar las interacciones (tanto covalentes como no covalentes) entre el soporte y el tejido de colágeno. La seda es un ejemplo de un soporte fibroso. La seda está formada en general por una fibra de proteína que puede estar compuesta principalmente por fibroína. Por ejemplo, las fibras de seda procedentes de gusanos de seda de cría normalmente tienen una sección transversal triangular con esquinas redondeadas, de 5-10 μm de ancho. La cadena pesada de fibroína está compuesta principalmente por láminas beta, debido a la secuencia de repetición de aminoácidos de 59 monómeros con algunas variaciones. Las fibras del gusano de seda se extruyen de manera natural a partir de dos glándulas del gusano de seda como un par de filamentos primarios (*brin*), que están pegados entre sí, con proteínas de sericina que actúan como pegamento, para formar un hilo de seda (*bave*). Los diámetros del hilo de seda para formar la seda tussah pueden alcanzar los 65 μm. La seda emitida por un gusano de seda puede consistir en dos proteínas principales, sericina y fibroína, siendo la fibroína el centro estructural de la seda, y siendo la serecina el material pegajoso que la rodea. La fibroína está compuesta por los aminoácidos Gly-Ser-Gly-Ala-Gly-Ala y forma láminas beta plegadas. Se forman enlaces de hidrógeno entre cadenas y se forman cadenas laterales por encima y por debajo del plano de la red de enlaces de hidrógeno.

Por tanto, el soporte puede ser una fibra de proteína que contiene grupos amina y ácido carboxílico, o fibras de celulosa que se producen de manera natural que contienen (o que se modifican para contener) grupos amina y ácido carboxílico. Las fibras que forman el soporte pueden modificarse químicamente para potenciar las interacciones del colágeno (liberado por células cultivadas) con el soporte. Por ejemplo, el soporte puede modificarse químicamente para contener grupos para la reticulación (covalente o no covalente) con colágeno, incluyendo aminas, ácidos carboxílicos, sulfatos, aldehídos, hidrazidas, sulfhidrilos, epóxidos, acrilatos, etc. Estos grupos de reticulación de tejidos pueden protegerse durante el crecimiento tisular y se activan para la reticulación cuando se completa el crecimiento tisular. En particular, la reticulación a la que se hace referencia en el presente documento puede activarse durante la curtición, que puede ser idéntica a, o derivarse de, los métodos y las técnicas de curtición tradicionales, incluyendo omitir aquellas etapas que se hacen innecesarias por el uso del cultivo tisular tal como se describe en el presente documento. Además, puede usarse una etapa de reticulación de refuerzo adicional para reticular compuestos químicos no implicados en el procedimiento de curtición tradicional (cualquiera distinto de grupos amina y ácido carboxílico). Entonces pueden usarse compuestos químicos de curtición tradicionales para dar el material compuesto de tejido biológico reforzado con fibras una estética similar a la del cuero. Los soportes también pueden estar formados por (y/o pueden incluir) fibras de carbono, que también pueden modificarse tal como se comentó anteriormente.

En general, estos grupos de reticulación de tejido pueden ser colgantes con respecto al soporte con un espaciador entre 10 daltons y 100 megadaltons. El soporte puede reticularse con el tejido a través de interacciones no covalentes que incluyen fuerzas iónicas, hidrófobas y de van der Waals. Alternativa o adicionalmente, el soporte puede reticularse con el tejido a través de enlaces covalentes. Por ejemplo, el soporte puede hacerse reaccionar directamente con grupos amina, ácido carboxílico y/o hidroxilo en el tejido. El soporte puede hacerse reaccionar con un agente de reticulación que reacciona con grupos amina, ácido carboxílico y/o hidroxilo en el tejido. El peso molecular del agente de reticulación puede ser de entre 10 daltons y 100 megadaltons. El tejido al que se hace referencia en el presente documento son las células cultivadas y/o los productos liberados por esas células cultivadas (por ejemplo, proteínas de la matriz extracelular, en particular colágeno). Cualquiera de los agentes de reticulación descritos en el presente documento puede incluir una funcionalidad del agente de reticulación de entre 2 y 2000. En cualquiera de los materiales formados tal como se describe en el presente documento, puede encontrarse en el material final una cantidad traza del agente de reticulación usado durante el procedimiento de formación (por ejemplo, menor del 0,001%, menor del 0,01%, menor del 0,1%, etc.); alternativamente no puede encontrarse ninguna cantidad traza. Por tanto, el material formado (el cuero artificial) puede tener una cantidad residual de agente de reticulación presente en el material, tal como entre el 0,0001% y el 1% (por ejemplo, menor de aproximadamente el 0,1%, menor del 0,01%, menor del 0,001%, etc., entre el 0,0001% y el 0,01%, etc.).

En general, el soporte puede estar compuesto por fibras. Las fibras adecuadas también pueden incluir fibras sintéticas. Las fibras sintéticas adecuadas incluyen, pero no se limitan a copolímeros de poliéster-poliuretano tales como elastano o LYCRA®, polímeros de poliparafenileno-tereftalamida tales como KEVLAR®, polímeros de nailon tales como nailon 6, nailon 6,6 y similares, y polímeros de poliéster tales como poli(tereftalato de etileno). Las fibras pueden ser de una dimensión o tamaño apropiado (por ejemplo, las fibras pueden tener una longitud de entre aproximadamente 100 nm y 1 m). Las fibras pueden unirse en una arquitectura tejida o no tejida (o una combinación de ambas). La densidad de las fibras en el soporte puede ser de entre 10 y 10.000 mg/cc. La porosidad del soporte fibroso puede ser de entre el 10 y el 99%.

Puede cultivarse cualquier célula apropiada sobre el soporte fibroso. Las células pueden originarse a partir de un tejido y/o línea celular. Por ejemplo, las células pueden tener como origen un mamífero (por ejemplo, bovino, porcino, ovino, etc.). Las células pueden tener como origen un reptil (por ejemplo, serpiente, lagarto, etc.). Las células pueden tener como origen un ave (por ejemplo, pollo, avestruz, pavo, etc.). Las células pueden tener como origen un pez (por ejemplo, tiburón, etc.). Las células pueden tener como origen un anfibio (por ejemplo rana,

salamandra, etc.). Las células pueden modificarse genéticamente (por ejemplo, para aumentar la producción de matriz extracelular “ECM”, incluyendo, por ejemplo, colágeno, etc.) o pueden no estar modificadas.

Breve descripción de los dibujos

Las características novedosas de la invención se exponen con particularidad en las reivindicaciones que siguen. Se obtendrá una mejor comprensión de las características y ventajas de la presente invención haciendo referencia a la siguiente descripción detallada que expone realizaciones ilustrativas, en las que se utilizan los principios de la invención, y los dibujos adjuntos de los que:

La figura 1A muestra una primera vista de un ejemplo de un soporte fibroso formado por fibras de seda que pueden usarse para formar el cuero fabricado por material compuesto descrito en el presente documento. En la figura 1A se muestra la imagen con un aumento reducido (la barra de escala es de 1 mm).

La figura 1B muestra el soporte fibroso de la figura 1A con un aumento superior (la barra de escala es de 0,5 mm).

Las figuras 2A y 2B ilustran el crecimiento tisular sobre un soporte fibroso tal como el soporte de seda mostrado en las figuras 1A-1B. La figura 2A muestra el soporte fibroso y la figura 2B muestra el soporte fibroso de la figura 2A tras cuatro semanas de cultivo de fibroblastos. Las células se sembraron sobre el soporte de fibras de seda mostrado en la figura 2A y después de cuatro semanas de cultivo, el soporte fibras está rodeado por tejido (figura 2B).

La figura 3 muestra un ejemplo de un soporte de seda sobre el que se cultivan fibroblastos, antes de la curtición. En la figura 3, una sección del soporte sobre el que se han cultivado fibroblastos (por ejemplo, durante cuatro semanas) se ha teñido con rojo picrosirio para visualizar el colágeno.

La figura 4 es una micrografía electrónica de barrido que muestra una porción de un soporte fibroso de seda sobre el que se han hecho crecer fibroblastos y que se ha permitido (y en algunas variaciones se ha estimulado) que secreten colágeno. El tejido rico en colágeno se ha hecho crecer por todo el soporte de fibra de seda.

La figura 5 muestra ejemplos de cuatro materiales compuestos diferentes de soportes fibrosos (seda, PLLA de alta densidad, poliéster, PLLA de baja densidad) y fibroblastos después de ocho semanas de cultivo, seguido por curtición. Sólo se curtió satisfactoriamente el material compuesto de soporte fibroso de seda para dar un material similar al cuero. Esto podría deberse a la presencia de grupos amina, ácido carboxílico e hidroxilo en la proteína de seda, aunque no pueden descartarse diferencias en la cantidad y el tipo de tejido formado sobre los diferentes soportes.

La figura 6 muestra un ejemplo de la superficie similar al cuero de un material compuesto de soporte fibroso de seda tras la curtición.

La figura 7 es un ejemplo del borde de un material compuesto de soporte fibroso de seda tras la curtición, en el que se produjo un gradiente de tejido hacia el borde del soporte de seda, revelando las fibras de seda dispersas por toda la matriz de tejido.

Descripción detallada

En el presente documento se describen cueros obtenidos mediante ingeniería formados usando un soporte fibroso que se curte (por ejemplo, se reticula) con las células cultivadas y/o cualquier componente de la matriz extracelular (ECM) liberado por las células cultivadas que se forman. El cuero obtenido mediante ingeniería resultante puede denominarse un material compuesto de tejido reforzado con fibras y pueden tener propiedades superiores (por ejemplo, durabilidad, resistencia, etc.) en comparación con otros cueros obtenidos mediante ingeniería. También se describen métodos de formación de estos materiales compuestos de tejido reforzados con fibra, incluyendo métodos de hacerlos crecer/cultivarlos y métodos de curtición de los mismos.

En general, los soportes descritos en el presente documento están configurados para reticularse con la matriz extracelular liberada (por ejemplo, colágeno, fibronectina, fibrina, ácido hialurónico, proteoglicanos, etc.) de células cultivadas sobre el soporte. Estos soportes pueden formarse de un material que puede formar reticulaciones con la ECM y/o las células durante la curtición. Además la estructura del soporte (por ejemplo, la porosidad, la longitud de las fibra, la densidad de las fibras, etc.) puede elegirse para permitir la reticulación y/o para estimular el crecimiento de las células y la liberación de la matriz extracelular. El soporte se curte con y a la ECM para formar el producto final, el material compuesto de tejido reforzado con fibras. Por tanto, el soporte forma una parte integral del producto final, y sus dimensiones, incluyendo el grosor, pueden ayudar a determinar el grosor final del cuero resultante.

Un ejemplo particular de un soporte fibroso que puede usarse tal como se describe en el presente documento es la seda. La seda (por ejemplo, la seda orgánica y/o sintética) puede formarse (por ejemplo, hilarse) hasta un grosor de fibra predeterminado y puede usarse en una lámina tejida y/o no tejida que forma el soporte sobre el que pueden

cultivarse células que liberan ECM. Tales células pueden ser, por ejemplo, fibroblastos dérmicos, células del músculo liso, etc.

En general, el soporte está formado por un material (tal como seda) que sea propicio para la unión celular y el crecimiento tisular. Además, el material del soporte puede contener compuestos químicos de superficie que adhieren la fibra del soporte al tejido para la transferencia de tensión eficaz en el material final. Las interacciones entre las fibras del soporte y el tejido pueden ser no covalentes, incluyendo interacciones electrostáticas, hidrófobas, dipolo-dipolo, de dipolo inducido o de van der Walls. Estas interacciones pueden ajustarse a través de compuestos químicos de la superficie de la fibra del soporte. Además, pueden introducirse interacciones covalentes o reticulaciones para formar un enlace químico entre la fibra del soporte y el tejido.

El soporte fibroso puede proporcionar una gran cantidad de área superficial sobre la que pueden cultivarse las células. Por ejemplo, el soporte puede estar formado por fibras relativamente dispersas que forman un soporte fibroso disperso. Un soporte fibroso puede tener mucha área superficial para permitir el crecimiento celular y para permitir una superficie de contacto de fibra-matriz tisular fuerte (lo que también puede mejorar la resistencia global del material compuesto resultante). En algunas variaciones, la longitud de las fibras que forman el soporte es de entre 100 nm y 100 μm. En algunas variaciones, la longitud de las fibras es de entre 100 nm y hasta 1 mm, 10 mm, 100 mm o 1 m. La densidad del material fibroso en el soporte puede ser de entre 10 y 100 mg/cc. En algunas variaciones, la densidad del material fibroso es de entre 10 y 10.000 mg/cc. La porosidad del soporte fibroso (incluyendo las fibras tejidas/no tejidas) puede ser de entre el 10 y el 99%.

En general, puede resultar ventajoso proporcionar una alta porosidad. Esto puede permitir mucha infiltración celular y crecimiento tisular, incluyendo dentro del grosor del soporte. El soporte puede tener cualquier grosor apropiado (por ejemplo, entre 10 μm y 5 mm, por ejemplo, entre 100 μm y 1 mm, entre 100 μm y 500 μm, entre 50 μm y 300 μm, etc., o entre cualquier valor menor de 10 μm, 30 μm, 50 μm, 75 um, 100 um, 200 um, 300 μm , etc. y un valor superior de 50 μm, 100 μm, 150 μm, 200 μm, 300 μm, 400 μm, 500 μm, 600 μm, 700 μm, 800 μm, 900 μm, 1 mm, 2 mm, 3 mm, 4 mm, 5 mm, etc.). La porosidad puede determinarse como el espacio (por ejemplo, diámetro promedio) entre fibras.

En funcionamiento, el método de formación de los materiales compuestos de tejido reforzados con fibras descritos en el presente documento puede incluir cultivar células sobre el soporte fibroso hasta que se ha formado una cantidad deseada de ECM (por ejemplo, colágeno) en y/o sobre el soporte fibroso. Opcionalmente, el soporte fibroso puede formarse y/o prepararse para recibir las células que van a cultivarse sobre el mismo. Por ejemplo, el soporte puede tratarse para exponer grupos reactivos o sitios de unión celular. En algunas variaciones, el soporte fibroso puede aplicarse en un reactor celular para la siembra y el crecimiento de las células sobre el soporte. Como ejemplo, las células, que pueden ser por ejemplo una línea celular de mamífero que tiene propiedades conocidas de liberación de ECM, que van a sembrarse sobre el soporte fibroso preparado y que se permiten crecer, se dividen y depositan ECM. Las células pueden cultivarse en condiciones de cultivo típicas durante un periodo de tiempo apropiado (por ejemplo, 2-90 días). Pueden añadirse células adicionales durante este periodo. A continuación, el material resultante, que comprende el soporte fibroso con la ECM y las células liberadas, puede denominarse una construcción tisular intermedia (no curtida), que puede procesarse adicionalmente. Esta construcción tisular intermedia (no curtida) puede descelularizarse (por ejemplo, mediante el tratamiento con alcoholes u otros agentes) o no. La construcción tisular intermedia (no curtida) puede procesarse entonces mediante curtición, que puede incluir compuestos químicos de curtición tradicionales, así como reacciones de reticulación para reforzar el soporte para el tejido.

A continuación se proporciona un ejemplo de diversos métodos de refuerzo y curtición que pueden usarse y/o modificarse. El soporte fibroso y la ECM cultivada que crece sobre el soporte se curten (y se adhieren) entre sí mediante este procedimiento, y los materiales compuestos de tejido reforzados con fibras resultantes pueden usarse como material de cuero obtenido mediante ingeniería.

Puede incluirse una etapa de refuerzo para reticular la ECM depositada con el soporte fibroso revestido en la ECM, seguido por un procedimiento de curtición para producir el aspecto y la sensación del cuero tradicional. Aunque los compuestos químicos de curtición tradicionales pueden reticular eficazmente la ECM al soporte si el soporte tiene la funcionalidad apropiada (tal como grupos amina y ácido carboxílico de superficie), pueden incorporarse otros compuestos químicos de superficie de soporte y agentes de reticulación para reforzar la superficie de contacto ECM-soporte. Estos incluyen epóxido, acrilato, aldehído, sulfhidrilo, diazirinas, aril-azidas, etc., así como compuestos químicos protegidos que pueden activarse tras el crecimiento tisular para reducir la citotoxicidad de la superficie del soporte. El soporte puede modificarse con compuestos químicos reactivos antes de la siembra de células que cuelgan de moléculas espaciadoras de tamaño entre 0 Da y 100 MDa. Los compuestos químicos de la superficie del soporte pueden hacerse reaccionar directamente con la ECM o a través de agentes de reticulación con funcionalidad de entre 1 y 2000 y con un tamaño de entre 1 Da y 100 MDa. Además las moléculas de reticulación pueden polimerizarse dentro de la construcción de soporte-ECM con un tamaño de entre 1 Da y 100 MDa. La polimerización de estos agentes de reticulación puede iniciarse tras el crecimiento tisular con factores desencadenantes tales como exposición a la luz, cambio de temperatura, adición de iniciadores químicos, etc.

En general, puede usarse cualquier método de curtición apropiado, incluyendo un método derivado de la curtición tradicional, que puede dar como resultado cuero que tiene el aspecto y el tacto de los pellejos curtidos tradicionales. Por ejemplo, tras cultivar las células sobre los soportes tal como se describió anteriormente (por ejemplo, en un entorno estéril), la construcción tisular intermedia (no curtida) que consiste en células y ECM crecidas sobre el soporte fibroso plano (por ejemplo, lámina relativamente delgada, pero larga y ancha) puede lavarse (por ejemplo, para retirar el medio de cultivo), y curtirse. Pueden incluirse etapas tradicionales tales como calero (por ejemplo, tratamiento con un compuesto básico tal como lechada de cal y/o la adición de "activadores" incluyendo agentes de reducción de disulfuro, tales como sulfuro de sodio, cianuros, aminas, etc.). Sin embargo, tales etapas pueden modificarse ya que la construcción intermedia no incluye pelo, uñas y otra materia queratinosa que se encuentra normalmente en las pieles nativas. Tales etapas pueden mantenerse o modificarse para retirar algunos materiales de ECM y/o para hinchar y dividir las fibras en la construcción intermedia o para preparar de otro modo colágeno en la construcción para curtición.

Los métodos pueden incluir o evitar (como innecesario) el uso de agentes de pelambre tales como sulfuro de sodio, hidróxido de sodio, hidrosulfito de sodio, hidrosulfuro de calcio, dimetilamina y sulfhidrato de sodio.

También puede incluirse una etapa que retire el material celular a la vez que se conserva la ECM. Pueden usarse métodos de descelularización usados en la obtención de tejidos mediante ingeniería para este fin, incluyendo el uso de tensioactivos, enzimas, energía ultrasónica, ciclos de congelación-descongelación, etc.

También puede incluirse una etapa de desencalado. Por ejemplo, el pH del colágeno puede reducirse hasta un nivel inferior, de modo que las enzimas puedan actuar sobre él. Dependiendo del uso final del cuero, la construcción intermedia puede tratarse con enzimas para ablandarla, un proceso denominado rendido. Si se usa el rendido, una vez completado, la construcción tisular intermedia puede tratarse en primer lugar con sal y luego con ácido sulfúrico, si va a realizarse una curtición mineral, que puede reducir el pH de colágeno hasta un nivel muy bajo para facilitar la penetración del agente de curtición mineral en la sustancia. Este proceso se conoce como piquelado. La sal (por ejemplo, cloruro de sodio) puede penetrar más rápido que el ácido y limitar el efecto nocivo de una caída repentina del pH. Si se usa curtición vegetal, el agente de curtición puede ser un tanino. Los taninos son una clase de productos químicos astringentes polifenólicos que se encuentran de manera natural en la corteza y las hojas de muchas plantas. Los taninos se unen a las proteínas de colágeno y pueden ocultarlas y recubrirlas, haciendo que sean menos solubles en agua y más resistentes al ataque bacteriano. El proceso también pueden hacer que el material sea más flexible. Tradicionalmente, las cortezas primarias, procesadas en molinos de corteza y usadas actualmente, son castaño, roble, redor, tanoak, cicuta, quebracho, mangle, acacia y mirobálano. Tradicionalmente, los pellejos se estiran sobre armazones y se sumergen durante varias semanas en cubas de concentraciones crecientes de tanino. Las construcciones tisulares intermedias descritas en el presente documento pueden proporcionar un acceso más directo, más fácil a los taninos y, por tanto, pueden requerir menos tiempo de procesamiento en general.

En la curtición al cromo, antes de la introducción de la especie básica de cromo, pueden usarse varias etapas para preparar el material, tal como se mencionó anteriormente, incluyendo la introducción de agentes alcalinos tales como hidróxido de sodio, restablecimiento del pH neutro, rendido (ablandamiento con enzimas) y piquelado (disminución del pH del material que está procesándose, por ejemplo, con sal y ácido sulfúrico).

En la curtición tradicional, el pH es muy ácido cuando se introduce el cromo, para garantizar que los complejos de cromo sean lo suficientemente pequeños como para caber entre las fibras y los residuos del colágeno. Una vez que se logra el nivel deseado de penetración de cromo en la sustancia, el pH del material se eleva de nuevo para facilitar el proceso. Esta etapa se conoce como basificación. La curtición al cromo normalmente es más rápida que la curtición vegetal.

El sulfato de cromo (III) ($[Cr(H_2O)_6]_2(SO_4)_3$) se ha considerado durante mucho tiempo como el agente de curtición más eficaz y efectivo. Los compuestos de cromo (III) del tipo usado en curtición son significativamente menos tóxicos que el cromo hexavalente. El sulfato de cromo (III) se disuelve para dar el catión hexaacuacromo (III), $[Cr(H_2O)_6]^{3+}$, que a pH superior experimenta procesos denominados olación para dar compuestos de policromo (III) que son activos en curtición, que es la reticulación de la subunidades de colágeno. La química de $[Cr(H_2O)_6]^{3+}$ es compleja debido a la presencia de una variedad de ligandos. Algunos ligandos incluyen el anión sulfato, los grupos carboxilo del colágeno, grupos amina de las cadenas laterales de los aminoácidos, y agentes de enmascaramiento. Los agentes de enmascaramiento son ácidos carboxílicos, tales como ácido acético, usado para suprimir la formación de las cadenas de policromo (III). Los agentes de enmascaramiento permiten que el curtidor aumente adicionalmente el pH para aumentar la reactividad del colágeno sin inhibir la penetración de los complejos de cromo (III).

Tal como se mencionó anteriormente, el colágeno se caracteriza por un alto contenido de glicina, prolina e hidroxiprolina, habitualmente en la repetición -Gly-Pro-Hypro-Gly-. Estos residuos dan lugar a la estructura helicoidal del colágeno. El alto contenido en colágeno de la hidroxiprolina permite la reticulación significativa por enlaces de hidrógeno dentro de la estructura helicoidal. Los grupos carboxilo ionizados (RCO2-) se forman mediante la hidrólisis del colágeno por la acción del hidróxido. Esta conversión se produce durante el proceso de calero, antes de la

introducción del agente de curtición (sales de cromo). Los grupos carboxilo ionizados se coordinan como ligandos a los centros de cromo (III) de las agrupaciones de oxo-hidróxido.

La curtición aumenta la separación entre las cadenas de proteínas en el colágeno desde 10 hasta 17 Å. La diferencia concuerda con la reticulación por especies policromo, del tipo que surge a partir de la olación y la oxolación.

Después de la aplicación del agente de cromo, el baño puede tratarse con bicarbonato de sodio para aumentar el pH hasta 4,0-4,3. Este aumento induce la reticulación entre el cromo y el colágeno. El aumento de pH normalmente puede ir acompañado por un aumento gradual de la temperatura hasta 40ºC. El cuero curtido al cromo puede contener entre el 4 y el 5% de cromo. Esta eficacia se caracteriza por su estabilidad hidrotérmica aumentada del cuero, y su resistencia al encogimiento en agua caliente.

Pueden usarse otras formas de curtición, incluyendo las basadas en alumbre, circonio, titanio, sales de hierro, o una combinación de los mismos. Puede usarse curtición en blanco en las construcciones tisulares intermedias descritas en el presente documento. La curtición es un método que usa alumbre y sales de aluminio, generalmente junto con otros productos tales como yema de huevo, harina y otras sales. El material se curte en blanco sumergiéndolo en una disolución tibia de alumbre de potasa y sales (o equivalente), entre 20 y 30ºC. el proceso puede aumentar la flexibilidad, estirabilidad, suavidad y calidad resultante del cuero. La adición de yema de huevo y harina (o equivalentes) a la disolución de remojo convencional puede potenciar adicionalmente sus características de manipulación fina. Entonces, la construcción tisular intermedia se seca y se deja que se estabilice.

Dependiendo del acabado deseado, el material puede encerarse, enrollarse, lubricarse, aceitarse (por ejemplo, inyectarse con aceite), y/o secarse. Pueden formarse ante, nobuk, etc., por ejemplo, induciendo acabados de superficie. El material puede acabarse adicionalmente mediante una nueva curtición en blanco. Los agentes de la nueva curtición en blanco y/o colorantes pueden aplicarse al material para potenciar la resistencia física y las propiedades deseadas dependiendo del producto final. Puede usarse una fase final, el acabado, para aplicar el material de acabado a la superficie o para acabar la superficie.

Una vez que las células sobre el soporte fibroso se han hecho crecer hasta la densidad apropiada de modo que el material resultante (una vez curtido) tenga la resistencia deseada (por ejemplo, mayor de aproximadamente 200.000 células/cm^2 de área superficial de sustrato) y se ha formado el material “húmedo”, puede curtirse, tal como se describió anteriormente, usando cualquiera de los procedimientos de curtición (o curtición modificada) mencionados. Además, el material se trata normalmente mediante uno o más de otros procesos tras el cultivo (que pueden realizarse con las etapas de curtición mencionadas anteriormente, o después de las etapas de curtición).

Por ejemplo, el engrasado puede incluir la adición de lubricantes naturales o sintéticos a las fibras antes de formarlas para dar un material textil, lo que no sólo permite que las fibras del material se sequen sin adhesión interfacial (pegado) sino que también proporciona hidrofobicidad y otras propiedades al material. Los métodos descritos en el presente documento pueden proporcionar ventajas con respecto al engrasado habitual, porque el material, que puede tener una estructura/densidad de fibra predecible y altamente regular, puede tratarse definitivamente con una cantidad establecida de lubricante (material hidrófobo, por ejemplo, aceite, cera, grasa, etc.) para garantizar la penetración uniforme y/o regular, lo que no se garantiza con el cuero natural debido a la variabilidad en la estructura interna de las fibras. Estos métodos también pueden permitir el uso de lubricantes alternativos que normalmente podrían no considerarse debido a problemas con tamaño de la dispersión, es decir, en el cuero natural para una penetración profunda de las fibras, el tamaño de emulsión puede ser crítico con el fin de que sea lo suficientemente pequeño como para penetrar completamente dentro de la matriz de fibras, pero esto puede aliviarse tratando las fibras individualmente, tal como se describe en el presente documento. Además, estos métodos también pueden proporcionar características mejoradas de resistencia a la tracción y al rasgado, debido a un engrasado altamente eficaz. Finalmente, los métodos descritos en el presente documento pueden proporcionar una eficacia casi completa (por ejemplo, del 100%) en el agotamiento del reactivo, incluyendo el lubricante; además, el lubricante puede hacerse reaccionar de manera prácticamente inmediata con el material, en contraposición a tener que penetrar y luego fijar el lubricante como se requiere en el cuero natural. Esto da como resultado un proceso extremadamente eficiente desde el punto de vista energético y del material, usando menos productos químicos, temperaturas más bajas (ya que puede emplearse el engrasado “frío” o alternativamente puede realizarse un calentamiento/templado del material) y un uso reducido del agua lo que en consecuencia reducirá las necesidades de efluentes. En algunas variaciones, el porcentaje de engrasado (por ejemplo, el porcentaje de aceite lubricante en peso) puede ser menor del 12% (por ejemplo, entre el 0,1-15%, entre el 0,5-10%, etc. en peso del material). Además, puede incorporarse uno o más lubricantes en el propio material durante el procedimiento de formación, incluyendo antes de la curtición. En algunas variaciones, el engrasado puede realizarse inmediatamente después de la curtición del material. Los ejemplos de agentes de engrasado pueden incluir: aceites (por ejemplo, aceites sulfonados, aceite mineral, etc.), grasas (grasas animales, grasas vegetales, por ejemplo, glicéridos, etc.), lubricantes sintéticos, polisiloxanos, polímeros acrílicos lubricantes, lubricantes secos, etc. Las fibras y/o un material textil compuesto por las fibras descritas en el presente documento pueden hacerse resistentes al agua (por ejemplo, “impermeabilizantes”) mediante la adición de un agente tal como un agente hidrófobo, que puede incluir, pero no limitarse a, lubricantes hidrófobos (por ejemplo un polisiloxano modificado tal como Densodrin CD de BASF),

fluorocarbonos, polímeros acrílicos hidrófobos, estearatos de cromo, etc. La capacidad para hacer que cada fibra sea resistente al agua también puede aumentar la consistencia y pueden lograrse niveles variables de resistencia al agua de una manera controlada.

Resulta interesante que en algunas variaciones, los materiales descritos en el presente documento pueden usarse para formar un cuero cultivado sin engrasado como una etapa independiente tras el cultivo. Por ejemplo, el material de soporte de tejido fibroso puede incluir un material que proporcione suficiente retención de humedad y/o hidrofobicidad para evitar la necesidad de engrasado adicional. Por ejemplo, las fibras que forman el material de soporte pueden ser hidrófobas. Los soportes de tejido ligeramente hidrófobos pueden incluir polímeros (por ejemplo, poliésteres alifáticos, etc.).

La recurtición se realiza con materiales de cuero tradicionales para modificar las calidades del cuero, incluyendo el aumento/la disminución de la concentración del agente de curtición, y/o modificar las propiedades de las fibras y/o los materiales textiles resultantes que a la larga pueden mejorar el procesamiento adicional del material, incluyendo el secado. En cualquiera de los métodos descritos en el presente documento, la recurtición puede realizarse con el mismo agente de curtición o con uno diferente. La recurtición puede realizarse en el material. La recurtición puede combinarse cualquiera de las otras etapas descritas en el presente documento, incluyendo engrasado y/o secado. Además, el orden de estas etapas puede realizarse en cualquier secuencia apropiada (por ejemplo, recurtición, luego engrasado, etc.).

El teñido añade color a las fibras y/o el material textil resultante. Puede usarse cualquier colorante adecuado, en particular colorantes que sean apropiados para el cuero (por ejemplo, materiales de colágeno, aunque pueden usarse otros colorantes diseñados específicamente para materiales textiles incluyendo los que tienen reactividad compatible, por ejemplo colorantes reactivos. Tal como se ha mencionado, en algunas variaciones, puede incluirse un colorante o colorantes en la disolución de cultivo antes de la curtición o inmediatamente después de la curtición. Los colorantes pueden incluir colorantes ácidos (por ejemplo, colorantes ácidos metalizados previamente), colorantes básicos, colorantes directos, colorantes reactivos y colorantes de azufre. También puede usarse un colorante mordiente (por ejemplo, que incluye un mordiente para ayudar a unir el colorante al material).

También pueden añadirse otros tratamientos químicos tales como: retardadores de la llama, tratamientos de resistencia a la abrasión, tecnologías de termorregulación, tecnologías de gestión de la humedad, materiales particulados de rendimiento, etc.

Ejemplos

Las figuras 1-6 ilustran ejemplos de materiales compuestos de tejido reforzados con fibras y métodos para formarlos tal como se describió anteriormente.

Por ejemplo, las figuras 1A y 1B muestran un ejemplo de un soporte fibroso de tejido que puede usarse. En este ejemplo, el soporte está formado por fibras de seda. El soporte tiene un grosor de aproximadamente 0,5 mm, y diámetros de fibra de aproximadamente 15-20 micrómetros (por ejemplo, como promedio/media). En este ejemplo, la densidad total del material es de aproximadamente 80 mg/cc, que corresponde a una porosidad de aproximadamente el 95%. La orientación de las fibras puede afectar a las propiedades generales de los materiales, y el proceso de unión puede variarse para producir una variedad de arquitecturas no tejidas, tejidas y tricotadas. Además, la longitud de las fibras puede afectar a las propiedades generales del material, y la longitud, el diámetro y/o la porosidad de las fibras pueden variar. Por ejemplo, pueden usarse microfibras que tienen un diámetro de desde aproximadamente 10 μm (micrómetros) hasta 20 μm o más. La figura 1B muestra una vista ampliada de una región del soporte mostrado en la figura 1A.

La figura 2A muestra un ejemplo de un soporte fibroso “seco” (seda) antes de sembrarse con células. En la figura 2B, el soporte mostrado en la figura 2A se ha sembrado con células (en este ejemplo, fibroblastos dérmicos bovinos) a una densidad de $8{,}5x10^6$ células/ml. El volumen de las células sembradas fue de 100 $\mu l/cm^2$ de soporte (similar al mostrado en la figura 1A-1B). En este ejemplo, las células se siembran encima del soporte y se ha observado que se depositan (por ejemplo, por gravedad) sobre el soporte poroso. A continuación, el soporte puede girarse, voltearse, hacerse rotar, etc., lo que puede ayudar a distribuir las células y/o el medio de cultivo por todo el sustrato. En la práctica, puede ser beneficioso tener un sustrato fibroso que inicialmente sea poroso en más del 50%. Tal como se mencionó anteriormente, en algunas variaciones, el soporte puede modificarse para potenciar la unión celular.

En el ejemplo mostrado en la figura 2B, las células pueden cultivarse durante aproximadamente 4 semanas, con cambio regular de medios (por ejemplo, cada pocos días); las técnicas de cultivo tisular convencionales pueden adaptarse para su uso con el soporte; por ejemplo, pueden usarse factores de crecimiento, o agentes para potenciar la liberación y/o el tipo de ECM depositada. Además, pueden usarse entornos de cultivo dinámicos tales como perfusión o carga mecánica para potenciar la deposición de ECM. En las figuras 2A-2B, el soporte tiene un grosor de aproximadamente 0,5 mm. También pueden usarse soportes más gruesos (por ejemplo, hasta 5 cm). Después de cuatro semanas de cultivo, las fibras del soporte están rodeadas por tejido (incluyendo colágeno).

La figura 3 muestra una sección tomada de la construcción tisular intermedia a modo de ejemplo (no curtida) mostrada en la figura 2B en sección transversal a través del tejido. En este ejemplo, la mancha muestra (en rojo en la versión en color original) colágeno; las fibras del soporte se indican (en sección) por las puntas de flecha. Se muestra que la muestra tiene una red densa de colágeno que se extiende alrededor y a través (por ejemplo, dentro del soporte fibroso poroso). Se fijó esta muestra para histología. En la figura 4 se proporciona una imagen de microscopía electrónica de barrido de una construcción tisular intermedia (no curtida) similar a la mostrada en la figura 2B.

En la figura 4, se muestra una sección a través de un soporte fibroso sobre el que se han cultivado células que liberan colágeno. El soporte fibroso en este ejemplo es seda, y el SEM muestra tejido rico en colágeno que crece por todo el soporte de fibra de seda.

La figura 5 muestra una comparación entre diferentes soportes fibrosos para el cultivo tisular y la posterior curtición para dar un material similar al cuero. En la figura 5, el soporte de seda fue mucho más satisfactorio que el soporte de poli(ácido láctico), PLLA; el soporte de seda permitió la reticulación de refuerzo durante un procedimiento de curtición tal como se describe en el presente documento. En la figura 5, las células se han cultivado de manera equivalente en cuatro soportes fibrosos diferentes y se han curtido: seda 501, PLLA 503 de alta densidad, poliéster 505 y PLLA 507 de baja densidad. Sólo el soporte de seda incluyó grupos amina y ácido carboxílico que pueden reticularse con el tejido/ECM durante el procedimiento de curtición (curtición con sal de cromo). También hay diferencias en la densidad de las fibras y la capacidad de estos materiales para promover el crecimiento tisular. Estos soportes tenían cada uno aproximadamente 4 cm de largo y aproximadamente 1,5 cm de ancho; la seda 501 y el PLLA 507 de baja densidad tienen cada uno 0,5 mm de espesor y el PLLA de alta densidad y el poliéster tienen cada uno aproximadamente 1 mm de espesor. Después de la curtición, sólo las muestras en las que el soporte era reticulable durante la curtición (por ejemplo, la seda 501) dio como resultado materiales que tenían una textura y un aspecto similares al cuero nativo. La seda curtida sin células cultivadas no se parece al cuero nativo; el material resultante (seda sola) se separa.

Las figuras 6 y 7 ilustran un ejemplo de materiales compuestos de tejido reforzados con fibras formados tal como se describe en el presente documento después de la curtición. La figura 6 muestra una superficie exterior de un material curtido que se ha formado y procesado tal como se describió anteriormente. En este ejemplo, la superficie exterior similar al cuero tiene un tacto similar al cuero nativo. El material está formado por un soporte fibroso de seda sobre el que se han cultivado células (fibroblastos dérmicos) y se ha curtido la construcción tisular intermedia resultante. La figura 7 muestra una vista ampliada de una región de borde de una construcción tisular reforzada con fibras curtida (seda). Después de la curtición, se produjo un gradiente de tejido hacia el borde del soporte de seda, revelando las fibras de seda dispersas través de la matriz de tejido (en la derecha en la figura).

En general, el producto resultante tendrá un aspecto y tacto similares al cuero nativo, pero es diferente de manera detectable (por ejemplo, tras el examen de la ultraestructura). Por ejemplo, el material resultante tendrá el material de soporte fibroso disperso por todas partes, y normalmente está rodeado por ECM (por ejemplo, colágeno); el colágeno y el soporte se curten y se adhieren entre sí. Normalmente habrá una capa exterior de tejido sobre el soporte. La muestra puede someterse a prueba para determinar la resistencia a la tracción usando una máquina Instron. Se unen abrazaderas a los extremos de la muestra y se tira de la muestra en sentidos opuestos hasta la rotura. Se demuestra la buena adhesión cuando la muestra tiene una resistencia a la tracción de al menos 1 MPa. En cualquiera de las variaciones descritas en el presente documento, el material final (cuero) producido tal como se describe en el presente documento puede tener una variedad deseable de propiedades debido al método único de procesamiento/fabricación descrito en el presente documento. Por ejemplo, en cualquiera de los materiales descritos en el presente documento, el material puede tener una resistencia a la tracción (estimada tal como se describió anteriormente) mayor de aproximadamente 0,5 MPa, mayor de aproximadamente 0,6 MPa, mayor de aproximadamente 0,7 MPa, mayor de aproximadamente 0,8 MPa, mayor de aproximadamente 0,9 MPa, mayor de aproximadamente 0,95 MPa, mayor de aproximadamente 1,0 MPa, mayor de aproximadamente 1,1 MPa, mayor de aproximadamente 1,2 MPa, mayor de aproximadamente 1,3 MPa, mayor de aproximadamente.4 MPa, mayor de aproximadamente 1,5 MPa, etc.

Cuando en el presente documento se hace referencia a una característica o elemento como “sobre” otra característica o elemento, puede estar directamente sobre la otra característica o elemento o también pueden estar presentes características y/o elementos intermedios. En cambio, cuando se hace referencia a una característica o elemento como “directamente sobre” otras característica o elemento, no hay características o elementos intermedios presentes. También se entenderá que, cuando se hace referencia a una característica o elemento como “conectado”, “unido” o “acoplado” a otra característica o elemento, puede estar conectado, unido o acoplado directamente a la otra característica o elemento o pueden estar presentes características o elementos intermedios. En cambio, cuando se hace referencia a una característica o elemento como “directamente conectado”, “directamente unido” o “directamente acoplado” a otra característica o elemento, no hay características o elementos intermedios presentes. Aunque se describen o se muestran con respecto a una realización, las características y los elementos así descritos o mostrados pueden aplicarse a otras realizaciones. Los expertos en la técnica también apreciarán que las referencias a una estructura o característica que se dispone “adyacente” a otra característica pueden tener partes que se superponen o que subyacen a la característica adyacente.

La terminología usada en el presente documento es para el fin únicamente de describir realizaciones particulares y no se pretende que sea limitativa de la invención. Por ejemplo, tal como se usa en el presente documento, se pretende que las formas singulares “un”, “una” y “el/la” incluyan también las formas plurales, a menos que el contexto indique claramente otra cosa. Se entenderá además que los términos “comprende” y/o “que comprende,” cuando se usan en esta memoria descriptiva, especifican la presencia de características, etapas, operaciones, elementos y/o componentes establecidos, pero no excluyen la presencia o la adición de uno o más de otras características, etapas, operaciones, elementos, componentes y/o grupos de los mismos. Tal como se usa en el presente documento, el término “y/o” incluye todas y cada una de las combinaciones de uno o más de los elementos enumerados asociados y puede abreviarse como “/”.

Los términos relativos espacialmente, tales como “bajo”, “debajo de”, “inferior”, “sobre”, “superior” y similares, pueden usarse en el presente documento para facilitar la descripción para describir la relación de un elemento o característica con otro(s) elemento(s) o característica(s), tal como se ilustra en las figuras. Se entenderá que se pretende que los términos relativos espacialmente engloben diferentes orientaciones del dispositivo u operación en uso además de la orientación representada en las figuras. Por ejemplo, si se invierte un dispositivo en las figuras, los elementos descritos como “bajo” o “por debajo de” otros elementos o características se orientarían entonces “sobre” los otros elementos o características. Por tanto, el término a modo de ejemplo “bajo” puede englobar tanto una orientación de sobre como de bajo. El dispositivo puede orientarse de otro modo (rotado 90 grados o en otras orientaciones) y los descriptores relativos espacialmente usados en el presente documento pueden interpretarse en consecuencia. De manera similar, los términos “hacia arriba”, “hacia abajo”, “vertical”, “horizontal” y similares se usan en el presente documento con fines explicativos únicamente, a menos que se indique específicamente otra cosa.

Aunque los términos “primero” y “segundo” pueden usarse en el presente documento para describir diversas características/elementos (incluyendo etapas), estas características/elementos no deben limitarse por estos términos, a menos que el contexto indique otra cosa. Estos términos pueden usarse para distinguir una característica/elemento de otra característica/elemento. Por tanto, una primera característica/elemento comentada más adelante podría denominarse una segunda característica/elemento, y de manera similar, una segunda característica/elemento comentada más adelante podría denominarse una primera característica/elemento sin apartarse de las enseñanzas de la presente invención.

A lo largo de toda esta memoria descriptiva y de las reivindicaciones que siguen, a menos que el contexto requiera otra cosa, la palabra “comprender”, y variaciones tales como “comprende” y “que comprende” significa que pueden emplearse conjuntamente diversos componentes en los métodos y artículos (por ejemplo, composiciones y aparatos incluyendo dispositivo y métodos). Por ejemplo, se entenderá que el término “que comprende” implica la inclusión de cualquier etapa o elemento establecido, pero no la exclusión de cualquier otra etapa o elemento.

Tal como se usa en el presente documento en la memoria descriptiva y en las reivindicaciones, incluyendo tal como se usa en los ejemplos y a menos que se especifique expresamente otra cosa, todos los números pueden leerse como si estuvieran precedidos por la palabra “aproximadamente” o “alrededor de,” aunque el término no aparezca expresamente. La expresión “aproximadamente” o “alrededor de” puede usarse cuando se describe la magnitud y/o la posición para indicar que el valor y/o la posición descritos están dentro de un intervalo esperado razonable de valores y/o posiciones. Por ejemplo, un valor numérico puede tener un valor que es +/- el 0,1% del valor establecido (o intervalo de valores), +/- el 1% del valor establecido (o intervalo de valores), +/- el 2% del valor establecido (o intervalo de valores), +/- el 5% del valor establecido (o intervalo de valores), +/- el 10% del valor establecido (o intervalo de valores), etc. Cualquier valor numérico facilitado en el presente documento también debe entenderse que incluye aproximadamente o alrededor de ese valor, a menos que el contexto indique otra cosa. Por ejemplo, si se da a conocer el valor “10”, entonces también se da a conocer “aproximadamente 10”. Se pretende que cualquier intervalo numérico citado en el presente documento incluya todos los subintervalos incluidos en el mismo. También se entiende que cuando se da a conocer un valor que es “menor que o igual a” el valor, “mayor que o igual al valor” y posibles intervalos entre valores también se dan a conocer, según lo entienda de manera apropiada el experto en la técnica. Por ejemplo, si se da a conocer el valor “X”, también se da a conocer “menor que o igual a X” así como “mayor que o igual a X” (por ejemplo, cuando X es un valor numérico). También se entiende que a lo largo de la solicitud, los datos se proporcionan en varios formatos diferentes, y que estos datos representan puntos finales y puntos de partida, e intervalos para cualquier combinación de los puntos de datos. Por ejemplo, si se da a conocer un punto de datos particular “10” y un punto de datos particular “15”, se entiende que mayor que también se considera que se dan a conocer mayor que o igual a, menor que, menor que o igual a, e igual a 10 y 15 entre 10 y 15. También se entenderá que se da a conocer cada unidad entre dos unidades particulares. Por ejemplo, si se dan a conocer 10 y 15, entonces también se dan a conocer 11, 12, 13 y 14

REIVINDICACIONES

1. Método de formación de un material compuesto de tejido biológico reforzado con fibras, comprendiendo el método:

cultivar células sobre un soporte fibroso hasta que las fibras del soporte fibroso están rodeadas por tejido que comprende matriz extracelular a una densidad mayor de aproximadamente 200.000 células/cm^2 de área superficial de sustrato, formando una construcción tisular; y

curtir la construcción tisular para formar un material similar al cuero reforzado con fibras.

2. Método según la reivindicación 1, en el que cultivar comprende cultivar células sobre

- un soporte fibroso de seda,

- un soporte fibroso de proteína, en el que el soporte fibroso de proteína comprende uno o más de: un soporte fibroso de lana, un soporte fibroso de seda, un soporte fibroso de caseína, un soporte fibroso de fibrina o un soporte fibroso de colágeno

- un soporte de fibras de proteína que comprende grupos amina, ácido carboxílico, hidroxilo y sulfhidrilo

- un soporte fibroso celulósico, en el que el soporte fibroso celulósico comprende uno o más de un soporte fibroso de lino, un soporte fibroso de piña, un soporte fibroso de tunicado o un soporte fibroso de algodón, y/o

- un soporte de fibras sintéticas que facilita la unión celular y el crecimiento tisular, en el que el soporte de fibras sintéticas comprende uno o más de un soporte de fibras de carbono, un soporte de Kevlar, un soporte de licra, un soporte de nailon, un soporte de poliéster o un soporte de fibras de vidrio.

3. Método según una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que cultivar comprende cultivar las células sobre el soporte fibroso hasta que las fibras están rodeadas por colágeno.

4. Método según una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que cultivar comprende cultivar células sobre el soporte fibroso

- que comprende fibras que tienen una longitud de entre aproximadamente 100 nm y 1 m, y/o

- que tienen una porosidad de entre el 10 y el 99%.

5. Método según una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que cultivar comprende cultivar células de mamífero sobre el soporte fibroso.

6. Método según una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que curtir comprende reticular grupos amina, hidroxilo, sulfhidrilo, tirosilo y ácido carboxílico sobre las proteínas de la matriz extracelular en el tejido con el soporte.

7. Método según una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que curtir comprende reticular las fibras del soporte fibroso con el tejido a través de enlaces covalentes.

8. Método según una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que curtir comprende reticular las fibras del soporte fibroso con el tejido a través de interacciones iónicas, hidrófobas y de van der Waals.

9. Material compuesto de tejido biológico reforzado con fibras, comprendiendo el material:

un soporte fibroso curtido que comprende una pluralidad de fibras, en el que las fibras están rodeadas por matriz extracelular reticulada con la pluralidad de fibras a una densidad mayor de 0,05 μm, en el que hay buena adhesión entre la matriz extracelular y la pluralidad de fibras de modo que la resistencia a la tracción del material compuesto de tejido biológico reforzado con fibras es mayor de aproximadamente 1,0 MPa.

10. Material según la reivindicación 9, en el que el soporte es

- una fibra de proteína que se produce de manera natural que contiene un grupo funcional seleccionado del grupo que consiste en grupos amina, hidroxilo, sulfhidrilo, tirosilo y ácido carboxílico y combinaciones de los mismos

- una fibra celulósica que se produce de manera natural que contiene un grupo funcional seleccionado del grupo que consiste en grupos amina, hidroxilo y ácido carboxílico y combinaciones de los mismos, o
- una fibra sintética que contiene compuestos químicos de superficie para interaccionar con la matriz extracelular.

11. Material según la reivindicación 9, en el que las fibras se modifican químicamente para

- potenciar la adhesión de la matriz extracelular al soporte, y/o

- contener grupos reactivos que incluyen uno o más de: aminas, ácido carboxílicos, sulfatos, aldehídos, hidrazidas, sulfhidrilos, diazirinas, aril-azidas, acrilatos y epóxidos.

12. Material según la reivindicación 11, en el que los grupos reactivos se protegen durante el crecimiento tisular y se activan para la reticulación cuando se completa el crecimiento tisular.

13. Material según la reivindicación 11, en el que los grupos de reticulación de tejido son colgantes con respecto al soporte con un espaciador entre 1 dalton y 100 megadaltons.

14. Material según la reivindicación 11, en el que el soporte se adhiere al tejido a través de interacciones no covalentes que incluyen interacciones iónicas, hidrófobas y de van der Waals.

15. Material según la reivindicación 11, en el que el soporte se adhiere al tejido a través de enlaces covalentes.

16. Material según la reivindicación 11, en el que el soporte se hace reaccionar con un agente de reticulación que reacciona con grupos amina, hidroxilo, sulfhidrilo o ácido carboxílico en el tejido, en el que además el material comprende entre el 0,0001% y el 0,1% del agente de reticulación y el peso molecular del agente de reticulación es de entre 1 dalton y 100 megadaltons.

17. Material según la reivindicación 11, en el que

- el soporte comprende fibras tejidas, tricotadas o no tejidas que tienen una longitud entre 100 nm – 1 m,

- la densidad de material fibroso en el soporte es de entre 10 y 10.000 mg/cc, y/o

- la porosidad del soporte fibroso es de entre el 10 y el 99%.

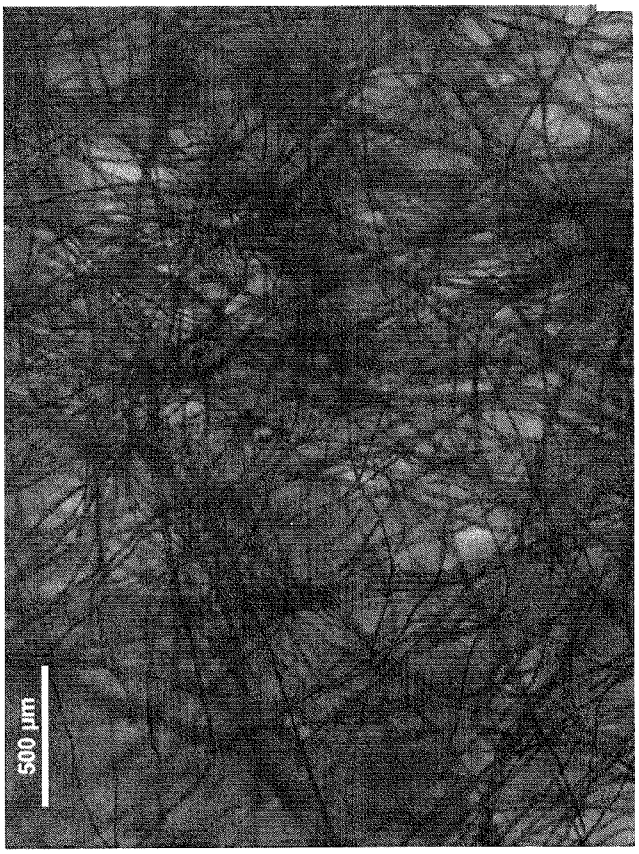


FIG. 1B



FIG. 2B

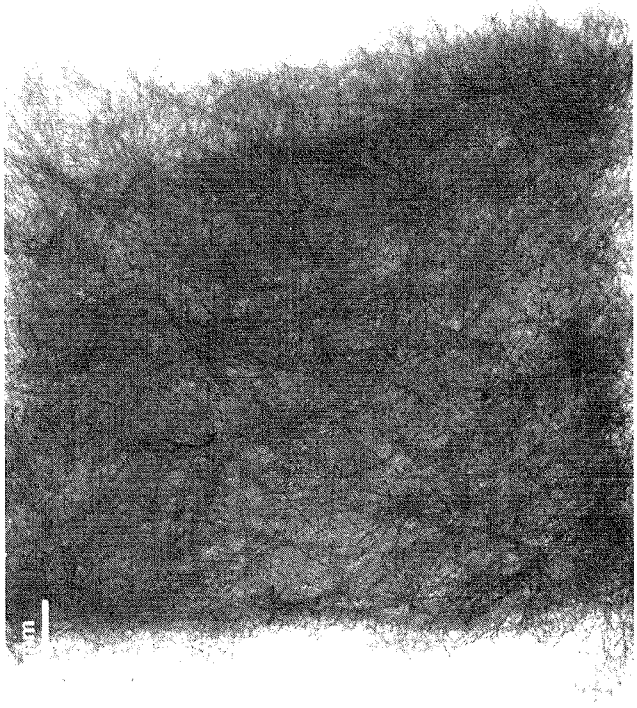


FIG. 1A

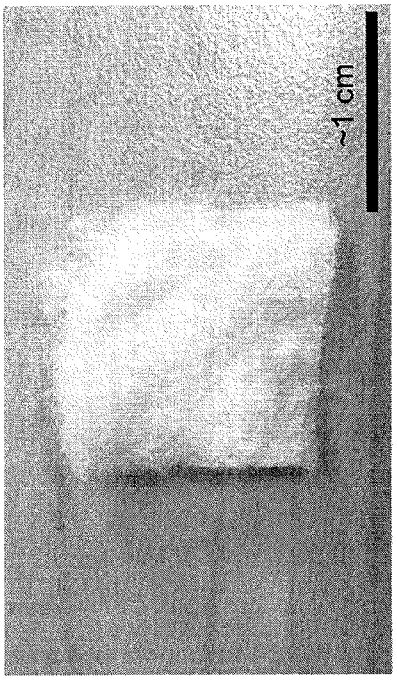


FIG. 2A

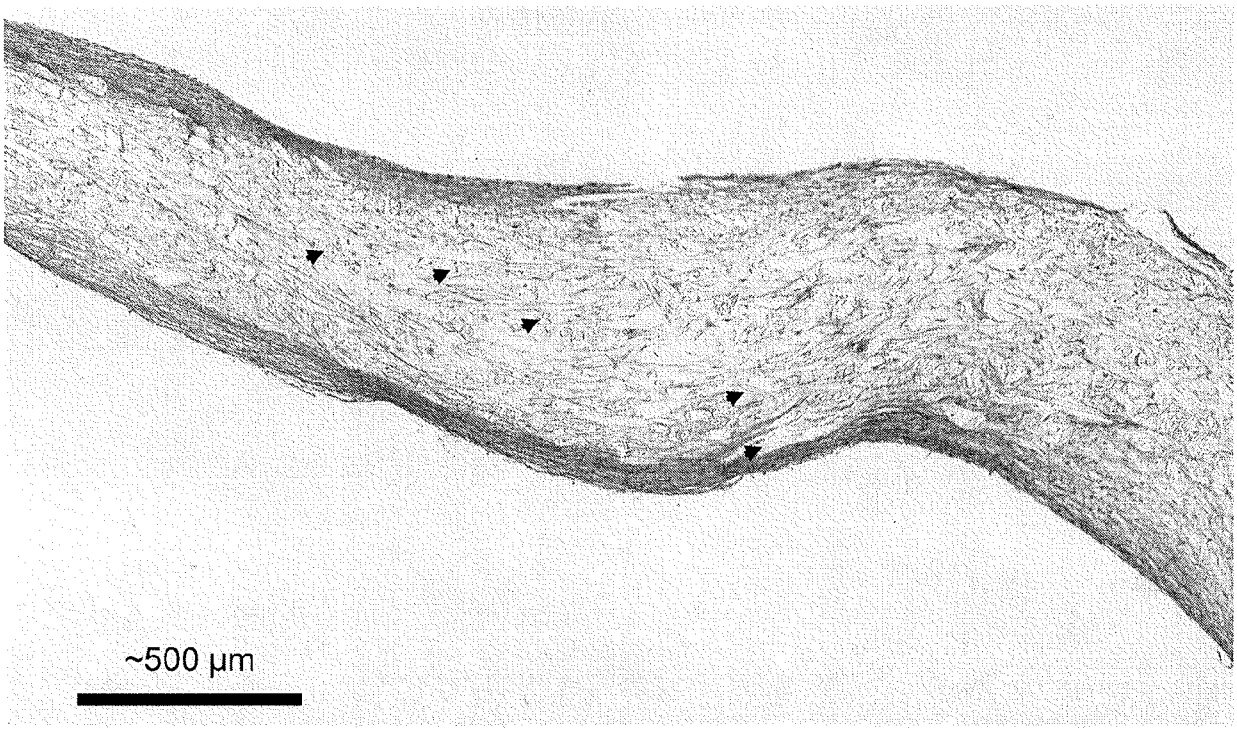


FIG. 3

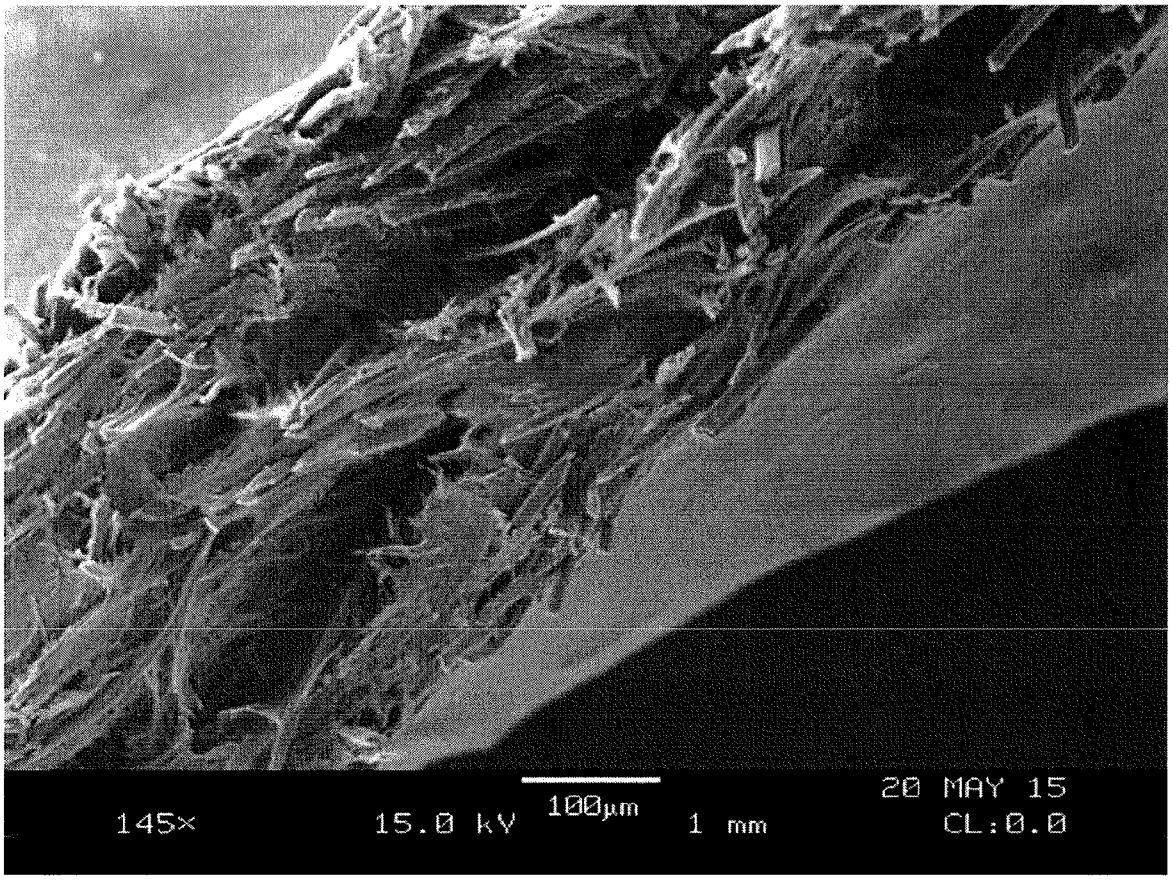


FIG. 4

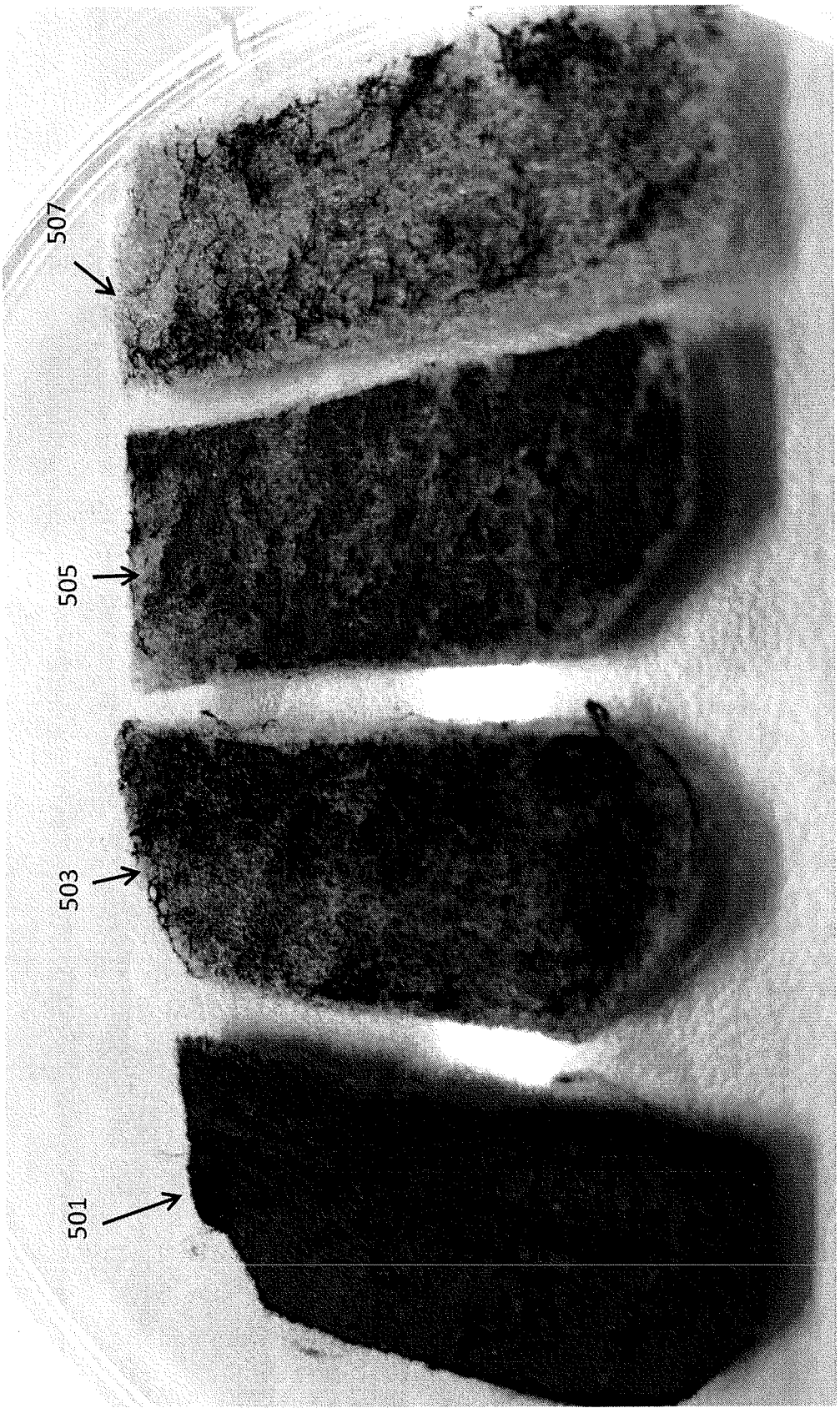


FIG. 5



FIG. 6

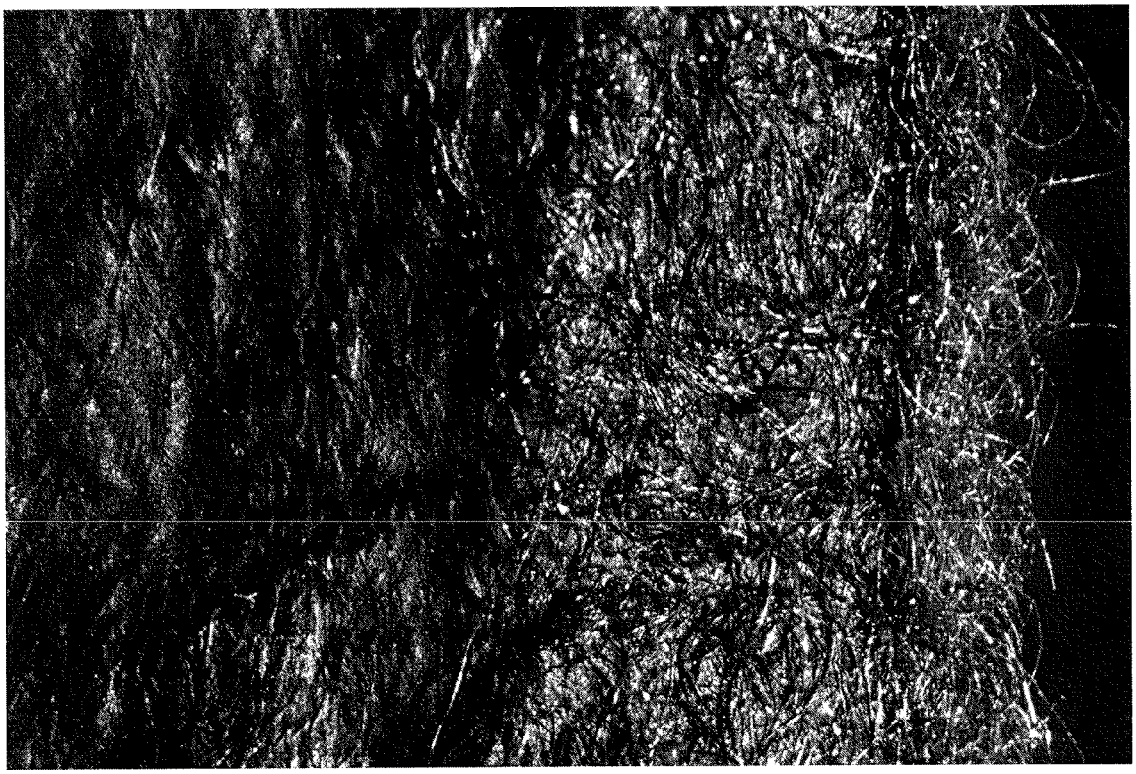


FIG. 7