

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **3 014 873**

51 Int. Cl.:

C08B 37/08 (2006.01)

A61K 38/39 (2006.01)

C07K 14/78 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **16.03.2021** **PCT/IB2021/052160**

87 Fecha y número de publicación internacional: **23.09.2021** **WO21186335**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **16.03.2021** **E 21717220 (4)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **01.01.2025** **EP 4121464**

54 Título: **Una biotinta para impresión 3D, conjugado relacionado y proceso de preparación de un intermedio que consiste en un enlazador fotorreactivo**

30 Prioridad:

17.03.2020 IT 202000005692

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

25.04.2025

73 Titular/es:

FIDIA FARMACEUTICI S.P.A. (100.00%)
Via Ponte della Fabbrica 3/A
35031 Abano Terme (PD), IT

72 Inventor/es:

GALESSO, DEVIS;
BENINATTO, RICCARDO;
PAVAN, MAURO y
DI LUCIA, ALBA

74 Agente/Representante:

MENDIGUTÍA GÓMEZ, María Manuela

ES 3 014 873 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

Una biotinta para impresión 3D, conjugado relacionado y proceso de preparación de un intermedio que consiste en un enlazador fotorreactivo

Objeto de la invención

La presente invención describe el uso de una biotinta para impresión 3D, un conjugado intermedio relacionado y el proceso de preparación de un intermedio que consiste en un enlazador fotorreactivo.

Un objeto de la presente invención es el uso de una biotinta para impresión 3D, es decir, de una tinta para ser utilizada tanto en el campo de la impresión 3D como en el campo de la bioimpresión 3D, comprendiendo dicha biotinta un conjugado fotorreticulable de ácido hialurónico y enlazador fotorreactivo bifuncional, o un conjugado fotorreticulable de gelatina y enlazador fotorreactivo bifuncional, o mezclas de los dos conjugados, fotorreticulables. Un objeto adicional de la invención es un conjugado de gelatina y un enlazador fotorreactivo bifuncional, consistiendo dicho enlazador en umbeliferona y un espaciador de trietilenglicol unidos a través de un enlace éter, siendo dicho conjugado reticulable.

Un objeto adicional de la presente invención es un proceso de preparación de un enlazador fotorreactivo bifuncional que consiste en umbeliferona unida a través de un enlace éter:

- a una cadena de trietilenglicol,

o

- a una cadena lineal de alquilo C4-C20, preferentemente una cadena de alquilo C8-C16, aún más preferentemente una cadena de octilo o una cadena de dodecilo,

siendo dicho enlazador capaz de unirse a HA o gelatina a través de la formación de un enlace amida y formando así el conjugado de HA o el conjugado de gelatina, fotorreticulable, comprendiendo dicho proceso las siguientes etapas:

- i) eterificación de la umbeliferona con N-BOC-2-[(2-p-tosiloxietoxi)etoxi]etilamina o con 8-((terc-butoxicarbonil)amino)(alquilo C4-C20) 4-metilbencenosulfonato, en presencia de acetona y carbonato de potasio;

- ii) reacción de desprotección del grupo amina a temperatura ambiente.

Estado de la técnica

Uno de los campos más interesantes para la reparación de daños en tejidos y órganos es sin duda la llamada ingeniería de tejidos, cuyo objetivo es fundamentalmente crear constructos (andamios) para ser aplicados en diversas lesiones, con el fin de favorecer la regeneración del tejido original o sustituir totalmente un órgano dañado.

En el proceso regenerativo, los constructos pueden albergar las células presentes en el lugar de la lesión, que lo colonizarán, o pueden contener células insertadas durante la etapa de preparación del constructo, con la función de activar, estimular y mejorar el proceso regenerativo, determinando el cierre de la lesión o la integración del órgano. Tales constructos deben tener naturalmente algunas características esenciales: deben estar completamente libres de toxicidad; deben ser biocompatibles; deben tener características mecánicas de resistencia y elasticidad adecuadas para el lugar del implante; deben ser capaces de garantizar la viabilidad, proliferación y organización celular, tanto cuando se trata de células presentes en el lugar del implante, como cuando las células se encapsulan en el biomaterial en la etapa de fabricación, mezclándolas con el hidrogel.

Por lo tanto, la ingeniería de tejidos resume aspectos típicamente biológicos con otros ciertamente ingenieriles, considerando además que los tejidos tienen características biológicas, bioquímicas y mecánicas profundamente diferentes: el hueso es muy diferente de la piel, el hígado del vaso sanguíneo.

El desarrollo tecnológico de la impresión tridimensional (impresión 3D) ha dado un impulso decisivo al campo de la ingeniería de tejidos: se trata de un conjunto de tecnologías capaces de generar un modelo físico a partir de una información digital. En pocas palabras, una impresora particular convierte una "tinta" de polímero de baja viscosidad (tinta) en una estructura sólida tridimensional perfectamente idéntica a un modelo anatómico, de acuerdo con las instrucciones proporcionadas por un ordenador debidamente programado.

La solidificación de la tinta se produce generalmente por irradiación a medida que se va liberando (extruyendo) gradualmente de la impresora: mediante reacciones de polimerización inducidas por la luz, la tinta se reticula, es decir, se polimeriza, transformándose en un sólido que tiene exactamente la forma predeterminada. Si es

deseable que el constructo final contenga células, es necesario que se mezclen con la tinta (encapsule) antes de la fase de extrusión: la tinta debe garantizar obviamente la viabilidad y la proliferabilidad del material celular contenido en ella. En este caso es más correcto hablar de bioimpresión 3D y la tinta se define como biotinta.

En el ámbito médico y quirúrgico, sin duda es muy útil poder disponer de modelos anatómicos personalizados para cada paciente, ya sean destinados a reparar un tejido o incluso a sustituir un órgano completo.

Las estructuras que se pueden obtener siguiendo estas técnicas también son particularmente adecuadas para la liberación de las sustancias activas incluidas en el constructo y para la creación de matrices sobre las que probar nuevos fármacos, contribuyendo así a su desarrollo más rápido, menos invasivo, menos costoso y éticamente correcto.

Un factor determinante para la preparación de las estructuras descritas es el tipo de tinta que, por el hecho de dar lugar a andamios con características muy peculiares, debe tener requisitos específicos tanto desde el punto de vista técnico (por ejemplo, fácil procesamiento) como desde el punto de vista biológico, como son la biocompatibilidad y muy baja o nula toxicidad.

Hasta la fecha, las tintas más comunes conocidas por el experto en la técnica consisten sustancialmente en polímeros biocompatibles entre los que se encuentran la gelatina, el ácido hialurónico, la fibroína, el alginato, la celulosa, modificados de forma diversa y/o mezclados entre sí.

Por ejemplo, el documento de patente WO2011088213 describe tintas formadas por ácido hialurónico y gelatina, derivatizadas con anhídrido metacrílico y fotopolimerizadas con luz UV en presencia de un fotoiniciador; Hölzl K et al. (Biofabrication 2016, 8(3):032002) describe una tinta a base de ácido hialurónico esterificado con anhídrido pentenoico que polimeriza en presencia de un fotoiniciador específico; Yin J. (ACS Appl. Mater. Interfaces 2018, 10, 6849-6857) describe las características de las tintas a base de gelatina reticulada con metacrilato, mezcladas adicionalmente con gelatina para mejorar su capacidad de impresión.

En general, en el estado de la técnica, independientemente del polímero utilizado, la polimerización se produce mediante el uso de un fotoiniciador, potencialmente tóxico, como lo es el metacrilato, que se utiliza para la modificación química del polímero de partida. Por lo tanto, un objetivo de la presente invención es identificar tintas que superen los inconvenientes de las tintas de acuerdo con el estado de la técnica.

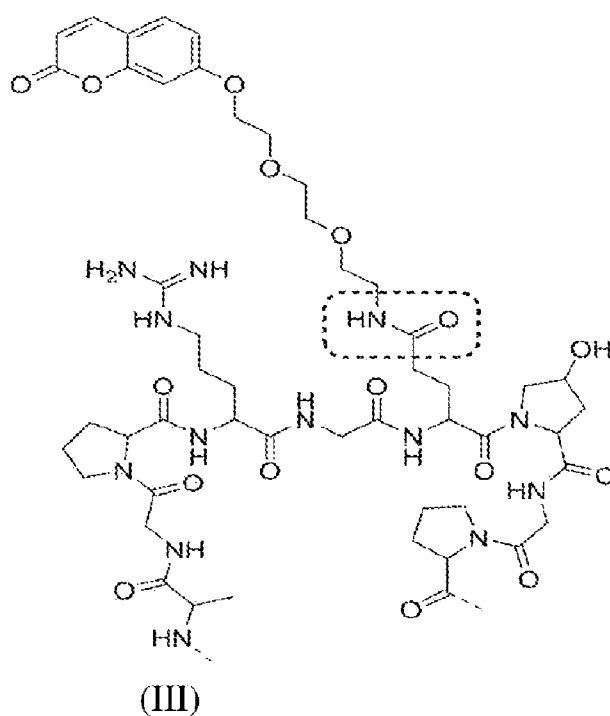
De hecho, las tintas objeto del uso de acuerdo con la presente invención no implican el uso de fotoiniciadores y no utilizan sustancias tóxicas para la derivatización del polímero de partida, dando lugar así a materiales con un perfil de seguridad muy elevado, tanto cuando se utilizan como tales como cuando contienen además material celular.

Además, están dotadas de todas las características funcionales, reológicas y mecánicas, que las hacen adecuadas para ser utilizadas tanto en la impresión 3D como en la bioimpresión 3D; por ello, y por simplicidad, las tintas descritas en la presente invención se definen siempre como bio-tinta o biotinta, incluso cuando no contienen células.

Descripción detallada de la invención

Un objeto de la presente invención es el uso de una biotinta para impresión 3D, es decir, el uso de una tinta para ser utilizada tanto en el campo de la impresión 3D como en el campo de la bioimpresión 3D, comprendiendo dicha biotinta un conjugado fotorreticulable de ácido hialurónico y enlazador fotorreactivo bifuncional, o un conjugado fotorreticulable de gelatina y enlazador fotorreactivo bifuncional, o mezclas de los dos conjugados fotorreticulables.

Otro objeto de la invención es un conjugado de gelatina y un enlazador fotorreactivo bifuncional unido a través de un enlace amida, consistiendo dicho enlazador en umbeliferona y un espaciador de trietilenglicol unido a través de un enlace éter, siendo dicho conjugado reticulable y teniendo la estructura de fórmula (III).



Un objeto adicional de la presente invención es un proceso de preparación de un enlazador fotorreactivo bifuncional que consiste en umbeliferona unida a través de un enlace éter:

- a una cadena de trietilenglicol,
- a una cadena lineal de alquilo C4-C20, preferentemente una cadena de alquilo C8-C16, aún más preferentemente una cadena de octilo o una cadena de dodecilo,

siendo dicho enlazador capaz de unirse a HA o a una gelatina a través de la formación de un enlace amida y formando así el conjugado de HA o el conjugado de gelatina, fotorreticulable, comprendiendo dicho proceso las siguientes etapas:

- i) eterificación de la umbeliferona con N-BOC-2-[(2-p-tosiloxietoxi)etoxi]etilamina o con 8-((terc-butoxicarbonil)amino)(alquilo C4-C20) 4-metilbencenosulfonato, en presencia de acetona y carbonato de potasio;
- ii) reacción de desprotección del grupo amina a temperatura ambiente.

Por lo tanto, la presente invención se refiere al uso de una bio-tinta (biotinta) para ser utilizada en el campo de la impresión 3D y en el campo de la bioimpresión 3D, comprendiendo dicha biotinta un conjugado de ácido hialurónico fotorreticulable o un conjugado de gelatina fotorreticulable o mezclas fotorreticulables de los mismos, que tiene las siguientes características:

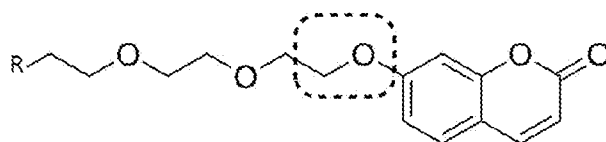
- biocompatibilidad total;
- capacidad de adherir células presentes en el sitio del implante y permitir su posterior proliferación;
- capacidad de encapsular células en la etapa de prepolimerización, manteniendo intacta su viabilidad post-polimerización;
- prepolimerización de baja viscosidad a temperatura inferior a la temperatura corporal, de modo que permita una buena extrusión en la etapa de impresión, con o sin material celular en su interior;
- una combinación de viscosidad y *esfuerzo de fluencia* (valor de tensión tangencial por debajo del cual el material es estático) capaz de permitir la extrusión del material y mantener la forma después de la extrusión durante un tiempo suficiente para que se realice la reticulación;
- esterilizabilidad; las biotintas de acuerdo con la presente invención pueden esterilizarse mediante filtración por filtros de 0,45 μm y/o tratamiento térmico en autoclave;
- alta tasa de polimerización, a fin de reducir el tiempo de exposición a la luz ultravioleta; dichas características son muy deseables, especialmente cuando la biotinta contiene células;
- características reológico-mecánicas adecuadas post-polimerización, que son diferentes dependiendo del ámbito de aplicación específico.

Las biotintas para su uso de acuerdo con la presente invención se preparan también mediante un proceso que utiliza reactivos de baja toxicidad y peligrosidad (no inflamables, no explosivos) y la reticulación se realiza sin utilizar ningún fotoiniciador.

Entre los diversos polímeros conocidos, la gelatina y el ácido hialurónico (AH) son particularmente indicados para los fines de la presente invención, los cuales se hacen fotorreticulables por conjugación con un enlazador fotorreactivo bifuncional, que, cuando se expone a la luz UV de una longitud de onda precisa, induce la polimerización a través de la reticulación, y luego la solidificación de la biotinta, sin la necesidad de utilizar un fotoiniciador.

El enlazador fotorreactivo bifuncional (que por razones de brevedad se define como "enlazador") utilizado de acuerdo con la presente invención es un enlazador de cumarina, es decir que consiste en un residuo de umbeliferona, unido a un espaciador, donde el espaciador puede ser un polietilenglicol, en particular trietilenglicol (TEG), o una cadena lineal de alquilo C4-C20, preferentemente una cadena de alquilo C8-C16, incluso más preferentemente una cadena de octilo o una cadena de dodecilo.

El enlazador fotorreactivo bifuncional TEG-Umbeliferona está representado por la siguiente fórmula (I):



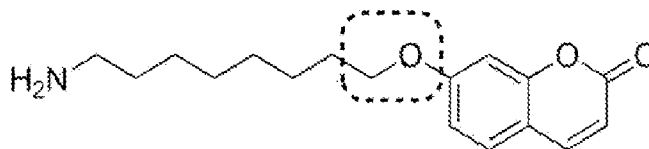
(I)

en la que:

R = -NH₂ para la formación de un enlace amida;

R = -I para la formación de un enlace éster.

La cadena alquílica del enlazador fotorreactivo bifuncional-Umbeliferona está representada por la siguiente fórmula (II):



(II)

Por lo tanto, el espaciador, sea cual sea, siempre se une por un extremo a la umbeliferona a través de un enlace éter y por el otro extremo se une al polímero seleccionado, es decir, HA o gelatina. El espaciador se funcionaliza adecuadamente en relación con el tipo de enlace éster o amida que se va a crear con el polímero. Más precisamente:

- El enlace entre el enlazador de umbeliferona-polietilenglicol y HA puede ser un enlace éster o amida;
- El enlace entre el enlazador de umbeliferona-alquilo y HA es exclusivamente amídico;
- El enlace entre el enlazador, umbeliferona-polietilenglicol o umbeliferona-alquilo, y la gelatina es siempre amídico.

La gelatina es producto de la desnaturalización del colágeno, es soluble en agua en la que crea soluciones viscosas y está reconocida como GRAS (*Generally Recognized As Safe* - Generalmente Reconocida Como Segura) por la FDA, la agencia regulatoria estadounidense.

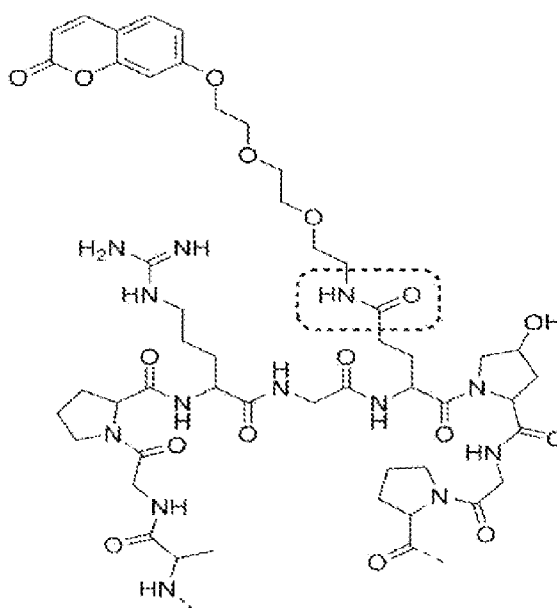
La gelatina es ampliamente utilizada en la industria alimentaria, farmacéutica, cosmética y nutracéutica, dentro de los complementos alimenticios para la salud de la piel, el cabello y las articulaciones. Comparada con el colágeno del que se produce, la gelatina es mucho menos inmunogénica, pero conserva los dominios RGD (secuencia de aminoácidos Arginina-Glicina-Ácido Aspártico), proporcionando un efecto de estimulación sobre la migración, proliferación y diferenciación celular, y los sitios de ataque para la degradación por MMPs (Metaloproteinasas de Matriz), que la hacen degradable enzimáticamente.

La gelatina utilizada preferentemente en la presente invención es de origen bovino de tipo B (es decir, obtenida

por hidrólisis básica de colágeno) y tiene aproximadamente 225 g de Bloom (capacidad de gelificación después del enfriamiento, medida de acuerdo con USP XX (1990) 1017). El conjugado de gelatina fotorreticulable se obtiene por conjugación de grupos carboxilo de gelatina por amidación con un enlazador fotorreactivo bifuncional, que consiste en un residuo de umbeliferona unida a un espaciador de polietilenglicol, preferentemente trietilenglicol, o una cadena lineal de alquilo de C4-C20, preferentemente una cadena de alquilo C8-C16, incluso más preferentemente una cadena de octilo o una cadena de dodecilo.

Más preferentemente, el conjugado fotorreticulable de gelatina se obtiene por conjugación de grupos carboxilo de gelatina por amidación con un enlazador fotorreactivo bifuncional, que consiste en un residuo de umbeliferona unida a un espaciador de trietilenglicol.

A continuación se conjuga con el enlazador fotorreactivo como se ha descrito anteriormente, preferentemente con el enlazador TEG-umbeliferona, a través de la formación de un enlace amida que involucra los grupos carboxilo de la gelatina y el espaciador adecuadamente funcionalizado, obteniéndose el conjugado de fórmula (III) que se muestra a continuación:



(III)

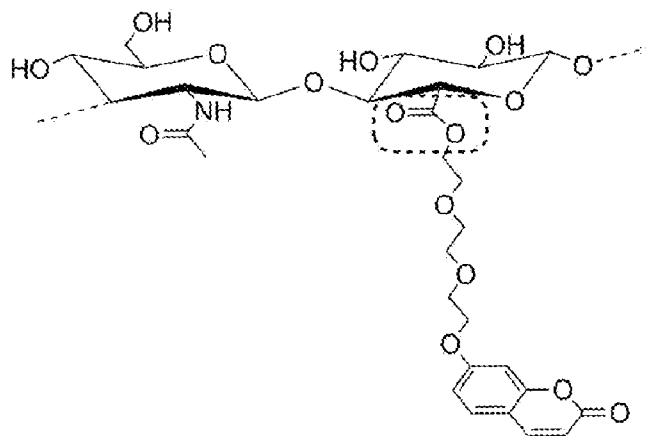
El ácido hialurónico es un heteropolisacárido compuesto por residuos alternados de ácido D-glucurónico y N-acetil-D-glucosamina, de cadena lineal, con un peso molecular que puede oscilar entre 400 y 3×10^6 Da, dependiendo de la fuente de extracción o del proceso de preparación utilizado. El HA está presente en cada área del organismo biológico y está involucrado en muchos procesos relacionados con el soporte mecánico de las células de muchos tejidos como la piel, los tendones, los músculos y el cartílago. El HA es determinante en el proceso de reparación tisular tanto desde el punto de vista estructural como como sustancia estimuladora de una amplia serie de procesos en los que interviene directa o indirectamente (Weigel P. et al., J Theoretical Biol, 1986:219-234; Abatangelo G. et al., J Surg Res, 1983, 35:410-416; Goa K. et al., Drugs, 1994, 47:536-566). Además, el HA está dotado de actividad antiinflamatoria, ya que modula la liberación de citoquinas, en particular IL-1, y tiene actividad analgésica, ya que se une a receptores opioides específicos.

Desde el punto de vista químico, la molécula de HA está provista de numerosos grupos funcionales que la hacen variablemente modificable, por ejemplo, mediante salificación con bases orgánicas o inorgánicas, mediante esterificación con alcoholes de diversa naturaleza, mediante amidación con aminas no terapéuticamente activas.

El ácido hialurónico de partida para preparar biotintas o biotintas descritas en la presente memoria descriptiva se puede producir y purificar de acuerdo con el procedimiento conocido, por ejemplo, mediante extracción a partir de crestas de gallo (EP138572), mediante fermentación a partir de *Streptococcus* (WO2018020458; WO2019016699), mediante biosíntesis a partir de *Bacillus* (WO2012032154). Se prefiere el HA producido y purificado a partir de *Streptococcus* o *Bacillus*, más preferentemente a partir de *Streptococcus*, con un PM promedio ponderal comprendido entre 100.000 y 250.000 Da, preferentemente entre 180.000 y 230.000 Da, definido por brevedad como "PM 200 kDa", o HA con un PM promedio ponderal comprendido entre 500.000 y 730.000 Da.

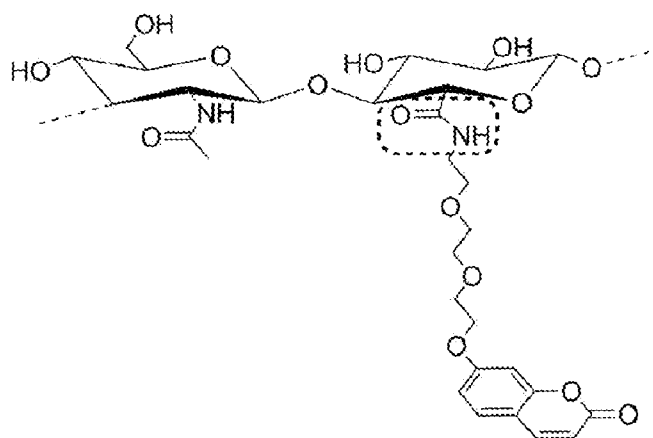
Por peso molecular (PM) promedio se entiende el PM promedio ponderal calculado por el procedimiento de "viscosidad intrínseca" (Terbojevich et al., Carbohydr Res, 1986, 363-377). Dentro del alcance de la presente invención, los conjugados de interés se obtienen por esterificación o amidación del grupo carboxilo del HA con un enlazador fotorreactivo bifuncional como el descrito anteriormente, constituido preferentemente por trietilenglicol unido a umbeliferona, obteniéndose los conjugados de fórmula (IV) y (V) que se muestran a continuación:

Éster de HA-TEG-Umbeliferona (IV)



(IV)

Amida de HA-TEG-Umbeliferona (V)



(V)

El enlace de HA-enlazador fotorreactivo bifuncional origina, tras la polimerización por reticulación, materiales que presentan diferente grado de degradabilidad según se trate de un enlace éster (más degradable) o amida (menos degradable), manteniendo sin embargo intactas las características de biocompatibilidad y no toxicidad.

El conjugado fotorreticulable de ácido hialurónico se obtiene por conjugación del grupo carboxilo del ácido hialurónico por esterificación o amidación con un enlazador fotorreactivo bifuncional, que consiste en un residuo de umbeliferona unida a un espaciador de polietilenglicol, preferentemente trietilenglicol, o una cadena lineal de alquilo C4-C20, preferentemente una cadena de alquilo C8-C16, aún más preferentemente una cadena de octilo o una cadena de dodecilo.

Más preferentemente, dicho conjugado fotorreticulable de ácido hialurónico se obtiene por conjugación del grupo carboxilo del ácido hialurónico por amidación con un enlazador fotorreactivo bifuncional, que consiste en umbeliferona unida a un espaciador de trietilenglicol; aún más preferentemente, el ácido hialurónico de partida se prepara y purifica a partir de *Streptococcus* (WO2018020458; WO2019016699) y tiene un PM promedio ponderal

comprendido entre 100.000 y 250.000 Da, preferentemente entre 180.000 y 230.000 Da.

Dichos derivados son ya conocidos por el experto en la técnica: el documento de patente WO2014122580 describe su síntesis y reivindica la capacidad de formar esponjas o hidrogeles con "memoria de forma", es decir, muy resistentes, compactos y capaces de mantener su forma también después del corte, torsión y manipulación.

Dentro del alcance de la presente invención, se demuestra que dichos derivados, usualmente utilizados en el tratamiento de la osteoartritis y lesiones cartilaginosas, en la prevención de adherencias postquirúrgicas, relleno de tejidos blandos y lesiones profundas y cavidades, son adecuados para el uso como biotinta para la fabricación de constructos mediante impresión 3D.

Es por lo tanto también objeto de la presente invención el uso de las biotintas descritas en la presente memoria descriptiva para la fabricación de constructos mediante impresión 3D.

El Solicitante también ha desarrollado un nuevo proceso de preparación del enlazador fotorreactivo bifuncional, adecuado para la formación de un enlace amida posterior que, con respecto al descrito en WO2014122580, utiliza reactivos no tóxicos y no inflamables, es más rápido, más barato, globalmente más seguro e industrialmente más conveniente.

La presente invención también se refiere a un proceso de preparación de un enlazador fotorreactivo bifuncional que consiste en umbeliferona unida a través de un enlace éter:

- a una cadena de trietilenglicol (TEG), o
- a una cadena lineal de alquilo C4-C20, preferentemente una cadena de alquilo C8-C16, aún más preferentemente una cadena de octilo o una cadena de dodecilo,

siendo dicho enlazador capaz de unirse a HA o a una gelatina a través de la formación de un enlace amida y formando así el conjugado de HA o el conjugado de gelatina, fotorreticulable, comprendiendo dicho proceso las siguientes etapas:

- i) eterificación de la umbeliferona con N-BOC-2-[(2-p-tosiloxietoxi)etoxi]etilamina o con 8-((terc-butoxicarbonil)amino)(alquilo C4-C20) 4-metilbencenosulfonato, en presencia de acetona y carbonato de potasio;
- ii) reacción de desprotección del grupo amina a temperatura ambiente.

Brevemente, el proceso mencionado anteriormente implica solo dos etapas distintas: inicialmente la etapa de eterificación en el que la umbeliferona se une a un reactivo N-BOC 2-[(2-p-tosiloxietoxi)etoxi]etilamina u 8-((terc-butoxicarbonil)amino) (alquilo C4-C20) 4-metilbencenosulfonato, preferentemente 8-((terc-butoxicarbonil)amino)octil 4-metilbencenosulfonato (comercializado por Ambeed) a través de una reacción rápida y limpia que implica el uso de acetona como disolvente de reflujo y carbonato de potasio como base.

Luego, el grupo amina se desprotege en un tiempo comprendido entre 1 y 6 horas, a temperatura ambiente, proporcionando el producto deseado (Umbeliferona-TEG-NH₂ o Umbeliferona-alquilo-C4-C20-NH₂) con un rendimiento cuantitativo, sin necesidad de purificación posterior.

Con respecto a lo descrito en WO2014122580, el procedimiento descrito anteriormente presenta numerosas ventajas: la síntesis es más rápida y económica, ya que sólo requiere dos etapas en lugar de las cinco etapas previstas en el documento de patente WO'580. Además, se utiliza una cantidad considerablemente menor de disolvente; se evita el uso de azida sódica, que provoca un alto riesgo químico; se evita una hidrogenación que implica el uso de Pd/C (Paladio/Carbono) como catalizador; el Paladio, debido a su potencial toxicidad, también debe eliminarse como residuo especial.

La biotinta para su uso de acuerdo con la presente invención, tanto cuando consiste en conjugado de HA o conjugado de gelatina como cuando consiste en una mezcla de los conjugados mencionados anteriormente, puede mezclarse opcionalmente además con material celular, tal como, por ejemplo, células de tejido conectivo, óseo, cartilaginoso, muscular o células mesenquimales y/o con otros componentes seleccionados entre los siguientes derivados de ácido hialurónico conocidos en el estado de la técnica, tales como:

- derivados de amida descritos en EP1095064 y EP1853279. Se prefieren los derivados de amida alifáticos, en particular la hexadecilamida preparada a partir de un HA que tiene un peso molecular promedio ponderal comprendido entre 500 kDa y 730 kDa, y que tiene un grado medio de amidación comprendido entre 0,1% y 10% molar, preferentemente comprendido entre 1% y 3% molar, detectado por HPLC después de la hidrólisis de la amida y la conjugación de la exadecilamina saliente con una sustancia fluorófora. La hexadecilamida que tiene las características mencionadas anteriormente y un grado medio de

derivatización comprendido entre 1% y 3% molar se describe en EP1853279 y está disponible bajo el nombre comercial HYADD®-4;

- ésteres internos autorreticulados con un porcentaje de esterificación no superior al 20%, preferentemente entre el 0,05 y el 10%, tal como se describe en la EP 0341745 y conocido en el estado de la técnica como ACP®;
- derivados reticulados, obtenidos mediante el uso de agentes reticulantes tales como BDDE (1,4-Butanediol diglicil éter), con un grado de derivatización entre 2,5 y 25% molar, preferentemente entre 5 y 15% molar con respecto a la unidad repetitiva de ácido hialurónico, y preparados a partir de HA con un PM promedio ponderal comprendido entre 500 y 730 kDa, tal como se describe en EP2470230, y conocidos con el nombre de HBC.

La mezcla con otros derivados de HA aumenta y hace ajustables las características reológicas de la biotinta y aumenta su resistencia a la acción degradativa de las hialuronidasas (Pavan 2016), haciéndolas así adecuadas para cualquier tipo de aplicación.

Preferentemente, la biotinta puede comprender como derivado adicional de HA:

- amidas descritas en EP1095064 y EP1853279, preferentemente hexadecilamida preparada a partir de un HA con un peso molecular promedio ponderal comprendido entre 500 kDa y 730 kDa, y que tiene un grado promedio de amidación comprendido entre 0,1% y 10% molar, preferentemente comprendido entre 1% y 3% molar (HYADD®-4);
- ésteres internos autorreticulados con un porcentaje de esterificación no superior al 20%, preferentemente entre 0,05 y 10%, como se describe en EP 0341745 (ACP®);
- reticulado obtenido mediante el uso de agentes de reticulación tales como BDDE (1,4-Butanediol diglicil éter), con un grado de derivatización entre 2,5 y 25% molar, preferentemente entre 5 y 15% molar con respecto a la unidad repetitiva de ácido hialurónico, y preparado a partir de HA que tiene un PM promedio ponderal comprendido entre 500 y 730 kDa, preparado como se describe en EP2470230 (HBC).

Aún más preferentemente, la biotinta puede comprender HYADD®-4 o HBC como otro derivado de HA.

La biotinta se prepara con concentraciones variables de los polímeros previamente descritos, en función del resultado a obtener, de las condiciones de procesamiento, en presencia o no de células dentro de la propia biotinta.

En particular, la biotinta puede comprender:

- Conjugado de HA con el enlazador fotorreactivo bifuncional a través de enlace éster o amida como se describió previamente, en concentraciones variables de 20 a 60 mg/ml, preferentemente comprendidas entre 30 y 50 mg/ml, aún más preferentemente iguales a 40 mg/ml;
- gelatina conjugada con el enlazador fotorreactivo bifuncional a través de enlace amida, en concentraciones variables de 20 a 60 mg/ml, preferentemente comprendidas entre 30 y 50 mg/ml, aún más preferentemente iguales a 40 mg/ml;
- mezclas de conjugado de HA y conjugado de gelatina, de composición variable en relación con el material a producir, estando la concentración total de los dos componentes en la mezcla comprendida entre 30 y 80 mg/ml, preferentemente entre 30 y 70 mg/ml, y estando más preferentemente comprendida entre 30 y 60 mg/ml; preferentemente, con respecto a la concentración total mencionada anteriormente, la concentración del conjugado de gelatina comprendida entre 10 y 30 mg/ml, más preferentemente entre 15 y 30 mg/ml, y aún más preferentemente es igual a 20 mg/ml;
- mezclas con HBC, HYADD®-4, ACP®: el polímero adicional (seleccionado entre HBC, HYADD®-4, ACP®) se mezcla en una proporción que varía de 1:1 a 5:1, preferentemente de 3:1 a 4:1 con el conjugado de HA o el conjugado de gelatina. Cuando el polímero adicional es HBC, la proporción preferente es 1:1. La concentración total de los componentes que forman las mezclas varía de 20 a 80 mg/ml, preferentemente de 40 a 70 mg/ml, más preferentemente de 40 a 60 mg/ml, y aún más preferentemente de 40 a 50 mg/ml.

En casos excepcionales, por ejemplo, cuando son necesarias condiciones reológicas específicas y el polímero adicional se selecciona entre HYADD®-4 y ACP®, la relación entre el polímero adicional y el conjugado de HA o el conjugado de gelatina puede variar incluso de 1:1 a 1:2, preferentemente es igual a 1:1,5.

Para ilustrar mejor el objetivo y las ventajas de la presente invención, se proporcionan algunos ejemplos.

Ejemplo 1: Síntesis del conjugado de HA-TEG-Umbeliferona a través del enlace éster a partir de HATBA de PM 200 kDa (como se informa en el Ejemplo 9 de WO2014122580)

Brevemente, en un reactor de vidrio equipado con una camisa de glicol termostatizable y agitación magnética, se disolvieron 2,0 g de HATBA (HA tetrabutylamonio) en 240 ml de DMSO anhidro y se añadieron 521 mg de 7-(2-

(2-(2-yodoetoxi)etoxi)etoxi)-2H-cromen-2-ona (preparada como se informa en el Ejemplo 3 de WO2014122580). La reacción transcurre durante 48 horas a 40 °C; a continuación, se añade una solución saturada de NaBr bajo agitación, por lo que se efectúa la precipitación añadiendo EtOH. El producto se purifica lavando en EtOH/H₂O 95:5 y EtOH absoluto, y después se seca a alto vacío. El producto así obtenido se analiza por FT-IR, RP-HPLC y ¹H NMR, mostrando una funcionalización igual al 32% y un rendimiento del 92%.

Ejemplo 2: Síntesis del enlazador Umbeliferona-TEG-amina a ser unido a HA o gelatina a través de enlace amida (2 etapas)

Etapas 1 de 2: Síntesis de (2-(2-(2-((2-oxo-2H-cromen-7-il)oxi)etoxi)etoxi)etil)carbamato de t-butilo

En un matraz de dos bocas provisto de agitador magnético, flujo de nitrógeno, baño de aceite y refrigerante se introducen umbeliferona (221 mg), K₂CO₃ (0,94 g; 5 eq.) y acetona anhidra (10 ml), seguido de 18-corona-6 en cantidad catalítica (0,01 eq.), luego N-BOC 2-[(2-p-tosiloxietoxi)etoxi]etilamina (0,49 g; 0,85 eq.). La reacción se deja proceder a reflujo bajo agitación durante 48 horas. La mezcla de reacción enfriada a través de un embudo Gooch se filtra y la acetona se elimina a baja presión. Se recupera con DCM (diclorometano), y se extrae con H₂O:NaHCO₃ (sat) 1:1. La fase orgánica, pasada sobre MgSO₄- 12H₂O, se seca en rotavapor y bomba mecánica. Los análisis de ¹H NMR y HPLC-MS confirman la formación del producto deseado en forma de aceite de color marrón amarillento (0,50 g; rendimiento: 94%).

Etapas 2 de 2: Síntesis de 7-(2-(2-(2-aminoetoxi)etoxi)etoxi)-2H-cromen-2-ona

En un matraz de dos bocas, que contiene (2-(2-(2-((2-oxo-2H-cromen-7-il)oxi)etoxi)etoxi)etil)carbamato de t-butilo (0,50 g), se crea una atmósfera anhidra. A continuación, se introducen DCM (10 ml), agua Milli-Q® (200 µl) (agua destilada o bidestilada), seguido de TFA (ácido trifluoroacético - 20,0 ml), y se deja proceder la reacción bajo agitación, a temperatura ambiente, durante 3 horas. El disolvente se elimina a través del rotavapor, recuperándose tres veces con DCM, luego se seca en el rotavapor y en bomba mecánica durante una noche. Un análisis HPLC-MS confirma la naturaleza del producto deseado, con una pureza cromatográfica del 95%.

Ejemplo 3: Síntesis del conjugado de HA-TEG-Umbeliferona a través del enlace amida a partir de HANA de PM 200 kDa

En un matraz de dos bocas equipado con agitador magnético y flujo de nitrógeno, se disuelve HANA 200 kDa (1,20 g; 2,99 mmol) en 40 ml de tampón MES (ácido 2-(N-morfolino) etanosulfónico) 0,1 M a pH=6, a temperatura ambiente. Tras la disolución completa, se añaden 516 mg de clorhidrato de N-(3-dimetilaminopropil)-N-etil-carbodiimida (EDC.HCl), 310 mg de N-hidroxisuccinimida y 7-(2-(2-(2-aminoetoxi)etoxi)etoxi)-2H-cromen-2-ona (predisuelto en 10 ml de MES), a continuación se deja que la reacción proceda en atmósfera anhidra a 25 °C durante 18 horas. La mezcla de reacción se dializa durante 2 días frente a agua milli-Q y se liofiliza, obteniéndose 1,496 g de liofilizado blanco. El liofilizado se redisuelve en agua milli-Q, se añade NaCl(saturado) (1/10 del volumen de agua), se precipita con EtOH agitando vigorosamente la solución. Al final, se lava con mezcla hidroalcohólica EtOH/H₂O 9:1, luego un lavado final con EtOH(abs.). El disolvente se elimina a baja presión, obteniéndose el producto en forma de sólido pulverulento blanco (1,50 g; rendimiento cuantitativo). El grado de derivatización molar es igual a 10-11% mol/mol (RMN). Un análisis de titulación mediante HPLC demuestra la ausencia de cumarina libre.

Ejemplo 4: Síntesis del conjugado de Gelatina-TEG-Umbeliferona

En un matraz de dos bocas de 100 ml provisto de agitador magnético y baño de glicol se introducen 60 ml de PBS (solución tampón de fosfato) 0,01 M, pH = 7,4 y 1,2 g de gelatina bovina, luego se lleva la temperatura a 50 °C durante 10 minutos. La mezcla de reacción se deja enfriar a 30 °C y se desgasifica bajo corriente de nitrógeno durante 10 minutos. Se añaden 0,38 g de clorhidrato de N-(3-dimetilaminopropil)-N-etil-carbodiimida (EDC HCl), 0,23 g de N-hidroxisuccinimida y 1,30 g de 7-(2-(2-(2-aminoetoxi)etoxi)etoxi)-2H-cromen-2-ona, manteniendo el pH de la solución entre 5 y 6. Se deja en agitación a 30 °C durante 24 horas. La mezcla de reacción se filtra a través de RC 0,45 µm (celulosa regenerada), luego se dializa durante 2 días contra agua Milli-Q®. Finalmente, se liofiliza, obteniéndose un liofilizado blanco-amarillento (0,74 g, rendimiento: 57%). El grado de sustitución molar, calculado por UV, resultó ser del 28%.

Ejemplo 5: Síntesis del enlazador de Umbeliferona-octilamina a ser unido a HA a través del enlace amida

Etapas 1 de 2: Síntesis de (8-((2-oxo-2H-cromen-7-il)oxi)octil)carbamato de terc-butilo

En un matraz de dos bocas provisto de agitador magnético, flujo de nitrógeno, baño de aceite y refrigerante, se introducen umbeliferona (221 mg), K₂CO₃ (0,94 g; 5 eq.) y acetona anhidra (10 ml), seguido de 18-corona-6 en cantidad catalítica (0,01 eq.), luego 8-((terc-butoxicarbonil)amino)octil 4-metilbencenosulfonato (0,49 g; 0,85 eq.). La reacción se deja proceder a reflujo bajo agitación durante 48 horas. La mezcla de reacción enfriada a través

de un embudo Gooch se filtra y se elimina la acetona a baja presión. Se recupera con DCM y se extrae con $\text{H}_2\text{O}:\text{NaHCO}_{3(\text{sat})}$ 1:1. La fase orgánica, pasada sobre $\text{MgSO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$, se seca en rotavapor y bomba mecánica. Los análisis de ^1H NMR y HPLC-MS confirman la formación del producto deseado en forma de aceite de color marrón amarillento (0,50 g; rendimiento: 94%).

Paso 2 de 2: Síntesis de 7-((8-aminooctil)oxi)-2H-cromen-2-ona

En un matraz de dos bocas, que contiene carbamato de (8-((2-oxo-2H-cromen-7-il)oxi)octilo) de terc-butilo (0,50 g), se crea una atmósfera anhidra. A continuación, se introducen DCM (10 ml), agua milli-Q (200 μl), seguido de TFA (20,0 ml), y se deja que la reacción se lleve a cabo bajo agitación, a temperatura ambiente, durante 3 horas. El disolvente se elimina a través de un rotavapor, recuperándose tres veces con DCM, luego se seca en rotavapor y en bomba mecánica durante una noche. Un análisis HPLC-MS confirma la naturaleza del producto deseado, con una pureza cromatográfica del 96%.

Ejemplo 6: Síntesis de HA-octil-umbeliferona a partir de HANA 200 kDa

En un matraz de dos bocas provisto de agitador magnético y flujo de nitrógeno, se disuelve HANA 200 kDa (1,20 g; 2,99 mmol) en 40 ml de tampón MES 0,1 M a pH=6, a temperatura ambiente. Tras disolución completa, se añaden 516 mg de clorhidrato de N-(3-dimetilaminopropil)-N-etil-carbodiimida (EDC·HCl), 310 mg de N-hidroxisuccinimida y 7-(2-(2-(2-aminoetoxi)etoxi)etoxi)-2H-cromen-2-ona (predisueños en 10 ml de MES), después se deja reaccionar en atmósfera anhidra a 25 °C durante 18 horas. La mezcla de reacción se dializa durante 2 días frente a agua milli-Q y se liofiliza, obteniéndose 1,496 g de liofilizado blanco. El liofilizado se redissuelve en agua milli-Q, se añade $\text{NaCl}_{(\text{saturado})}$ (1/10 del volumen de agua), se precipita con EtOH agitando vigorosamente la solución. Al final se lava con mezcla hidroalcohólica (EtOH/ H_2O 9:1), luego un lavado final con EtOH_(abs.). El disolvente se elimina a baja presión, obteniéndose el producto en forma de sólido pulverulento blanco (1,50 g; rendimiento cuantitativo). El grado de derivatización molar es igual a 9,1% mol/mol (GPC-UV), o 10-11% (MNR). Un análisis de titulación mediante HPLC demuestra la ausencia de cumarina libre.

Ejemplo 6a: Síntesis de HA-octil-umbeliferona a partir de HA-TBA (PM de HA 500 kDa)

En un reactor de vidrio equipado con una camisa de glicol termostatizable y agitación magnética, se introduce HA-TBA (2,23 g) y DMSO anhidro (230 ml), luego se deja que la mezcla proceda bajo agitación a 25 °C hasta la disolución completa de HATBA. Luego se introducen ácido metanosulfónico (70 μl) y 1,1'-carbonildiimidazol (CDI, 58 mg) y la mezcla se deja que proceda bajo agitación a temperatura ambiente durante 1 h. Finalmente, se agrega 7-((8-aminooctil)oxi)-2H-cromen-2-ona (1,04 g) preparada como se informa en el Ejemplo 5, previamente disuelta en 20 ml de DMSO, y se deja que la reacción proceda a 42 °C durante 42 horas. La mezcla se lleva a temperatura ambiente, luego se agrega una solución salina de NaBr (28 ml) gota a gota bajo agitación. Se precipita lentamente añadiendo EtOH frío al 96% (500 ml) y se filtra por Gooch. El precipitado se lava con una mezcla hidroalcohólica EtOH/agua 9:1 ($\times$ 4 veces) y finalmente con EtOH absoluto, luego se seca al alto vacío a 40 °C durante 3 días. El producto se presenta en forma de sólido pulverulento blanco-amarillento (1,54 g, rendimiento cuantitativo). El grado de derivatización molar es igual a 11% mol/mol (^1H NMR).

Ejemplo 6b: Síntesis de HA-dodecil-umbeliferona a partir de HA-TBA (PM de HA 500 kDa)

Síntesis de 7-((12-aminododecil)oxi)-2H-cromen-2-ona: el compuesto se ha sintetizado como se informa en el Ejemplo 5, etapas 1 y 2, reemplazando 8-((terc-butoxicarbonil)amino)octil 4-metilbencenosulfonato por 12-((terc-butoxicarbonil)amino)dodecil 4-metilbencenosulfonato, con las mismas relaciones estequiométricas.

En un reactor de vidrio equipado con una camisa de glicol termostatizable y agitación magnética, se introduce HA-TBA (2,23 g) y DMSO anhidro (230 ml), luego se deja que la mezcla proceda bajo agitación a 25 °C hasta la disolución completa de HA-TBA. A continuación, se introducen ácido metanosulfónico (70 μl) y 1,1'-carbonildiimidazol (CDI, 58 mg) y la mezcla se deja que proceda bajo agitación a temperatura ambiente durante 1 hora. Finalmente se agrega 7-((12-aminododecil)oxi)-2H-cromen-2-ona (1,24 g), previamente disuelto en 20 ml de DMSO, y se deja que la reacción proceda a 42 °C durante 42 horas. La mezcla se lleva a temperatura ambiente, luego se agrega una solución saturada de NaBr (28 ml) gota a gota bajo agitación. Se precipita lentamente añadiendo EtOH frío al 96% (500 ml) y se filtra por Gooch. El precipitado se lava con una mezcla hidroalcohólica EtOH/agua 9:1 ($\times$ 4 veces) y finalmente con EtOH absoluto, luego se seca al alto vacío a 40 °C durante 3 días. El producto se presenta en forma de sólido pulverulento blanco-amarillento (1,53 g, rendimiento: 97%). El grado de derivatización molar es igual a 13% mol/mol (^1H NMR).

Ejemplo 6c: Síntesis de gelatina-octil-umbeliferona

Etapas 1 de 2: Síntesis de Gelatina-TBA

Se lavan 60 g de resina Amberlyst® con agua Milli-Q® dentro de un matraz dejando reposar la mezcla durante 5',

para luego filtrar por Gooch. El procedimiento se repite 4 veces. Se añade TBA-OH 55% (-180 ml), se agita y se deja reposar durante una noche a temperatura ambiente. Contextualmente, se disuelven 5,2 g de gelatina en 250 ml de agua Milli-Q®, dejando en agitación a temperatura ambiente durante una noche. La resina se lava con aproximadamente 5 L de agua Milli-Q®, hasta que el eluato presente pH < 10,5 (pH inicial=12,84; pH final=10,48), luego se transfiere a un vaso de precipitados de 1 L, y se deja proceder a la mezcla resina/gelatina bajo agitación en agua durante 24 horas a temperatura ambiente. Al final, la mezcla se filtra a través de Gooch, se enjuaga con más agua Milli-Q® (200 ml) y se deja con agitación 30' antes de volver a filtrarla a través de Gooch. Después de la filtración completa, el pH de la solución se ajusta a $5,0 \pm 0,1$ añadiendo HCl 1,0 M, luego se liofiliza. El producto deseado se obtiene en forma de liofilizado blanco-amarillento (4,2 g, rendimiento 64%). El producto revela una solubilidad en DMSO igual a 20 mg/ml a temperatura ambiente. Un análisis realizado a través de GPC-SEC-TDA revela un título de gelatina-TBA igual a 74,1%.

Etapa2 de 2: Síntesis de gelatina-octil-umbeliferona

En un reactor de vidrio equipado con una camisa de glicol termostatizable y agitación magnética, se introduce gelatina-TBA (2 g) seguida de 200 ml de DMSO anhidro, luego se deja disolver a 80 °C durante 30 minutos. Después de enfriar a 42 °C, se introduce 1,1'-carbonildiimidazol (CDI, 84 mg) y se deja que la mezcla proceda bajo agitación durante 1 h. Luego se introduce 7-((8-aminooctil)oxi)-2H-cromen-2-ona (0,5 g) preparada como se informa en el Ejemplo 5 y se deja que la reacción proceda bajo agitación a 42 °C durante 42 horas. Luego se lleva T a 20 °C, se agrega NaBr (saturado) (20 ml) gota a gota y se precipita agregando EtOH frío (600 ml). El precipitado se lava con mezcla hidroalcohólica EtOH/agua 9:1 ($\times$ 4 veces) y finalmente con EtOH absoluto, luego se seca al alto vacío a 40 °C durante 3 días.

El producto se presenta en forma de sólido pulverulento de color blanco amarillento (1,5 g, rendimiento: 89%). El grado de derivatización molar es igual a 22% mol/mol (UV).

Ejemplo 7: Formulación de biotintas

Se han formulado las biotintas que contienen los siguientes componentes:

- FID-E:** éster de HA-TEG-Umbeliferona, preparado como se informa en el Ejemplo 1;
- FID-A:** amida de HA-TEG-Umbeliferona, preparada como se informa en el Ejemplo 3;
- GEL:** gelatina-TEG-Umbeliferona, preparada como se informa en el Ejemplo 4;
- FID-C8:** HA-octil-umbeliferona, preparada como se informa en el Ejemplo 6a.

7.1 Formulación de FID-E 40 mg/ml

En un vaso de precipitados de vidrio se pesaron 400 mg de FID-E preparado como se informó en el Ejemplo 1; se agregaron 10 ml de solución salina (NaCl 0,9%) y se dejó disolver bajo agitación magnética. Luego de su completa disolución se filtró con filtro estéril de acetato de celulosa de 0,45 μ m.

7.2 Formulación de FID-A 40 mg/ml

En un vaso de precipitados se pesaron 400 mg de FID-A preparado como se informó en el Ejemplo 3; se agregaron 10 ml de solución salina (NaCl 0,9%) y se dejó disolver bajo agitación magnética. Luego de su completa disolución, la solución se transfirió a jeringas de vidrio de 3 ml y se esterilizó en autoclave a 121 °C durante 15 minutos.

7.3 Formulación de FID-E 40 mg/ml + GEL 20 mg/ml

En un vaso de precipitados de vidrio se pesaron 400 mg de FID-E preparado como se informó en el Ejemplo 1 y 200 mg de GEL preparado como se informó en el Ejemplo 4; se agregaron 10 ml de solución salina (NaCl 0,9%) y se dejó disolver bajo agitación magnética. Luego de su completa disolución, la solución se calentó a 80 °C durante 5' y se filtró con filtro estéril de acetato de celulosa de 0,45 μ m.

7.4 Formulación de FID-A 40 mg/ml + GEL 20 mg/ml

En un vaso de precipitados de vidrio se pesaron 400 mg de FID-A preparado como se informó en el Ejemplo 3 y 200 mg de GEL preparado como se informó en el Ejemplo 4; se agregaron 10 ml de solución salina (NaCl 0,9%) y se dejó disolver bajo agitación magnética. Luego de su completa disolución, la solución se transfirió a jeringas de vidrio de 3 ml y se esterilizó en autoclave a 121 °C durante 15 minutos.

7.5 Formulación de FID-E 10 mg/ml + HYADD®-4 30 mg/ml

En un vaso de precipitados de vidrio se pesaron 100 mg de FID-E preparado como se informa en el Ejemplo 1, se

agregaron 10 ml de PBS pH 7,0 y se dejó disolver bajo agitación magnética. Luego de su completa disolución, los 10 ml se pasaron a un tubo Falcon de 50 ml, se agregaron 300 mg de HYADD®-4 y se colocó en estufa a 80 °C por 2 horas, mezclando con una espátula cada 20' aproximadamente. Luego de terminado el precalentamiento, se filtró en un prefiltro de 0,5 mm y se repartió en jeringas de vidrio de 3 ml y se esterilizó en autoclave a 121 °C durante 15 minutos.

7.6 Formulación de FID-E 10 mg/ml + HYADD®-4 40 mg/ml

En un vaso de precipitados de vidrio se pesaron 100 mg de FID-E preparado como se informa en el Ejemplo 1, se agregaron 10 ml de PBS pH 7,0 y se dejó disolver bajo agitación magnética. Luego de su completa disolución, los 10 ml se pasaron a un tubo Falcon de 50 ml, se agregaron 400 mg de HYADD®-4 y se colocó en estufa a 80 °C por 2 horas, mezclando con una espátula cada 20' aproximadamente. Luego de terminado el precalentamiento, se filtró en un prefiltro de 0,5 mm y se repartió en jeringas de vidrio de 3 ml y se esterilizó en autoclave a 121 °C durante 15 minutos.

7.7 Formulación de FID-E 10 mg/ml + HBC 30 mg/ml

En un vaso de precipitados de vidrio se pesaron 100 mg de FID-E preparado como se informa en el Ejemplo 1; se adicionan 10 ml de PBS pH 7,0 y se deja disolver bajo agitación magnética. Luego de su completa disolución, los 10 ml se transfieren a un tubo Falcon de 50 ml, se adicionan 300 mg de HBC y se coloca en estufa a 80 °C por 2 horas, mezclando con espátula cada 20' aproximadamente. Luego de completado el precalentamiento, se filtra en un prefiltro de 0,5 mm y se divide en jeringas de vidrio de 3 ml y se esteriliza en autoclave a 121 °C durante 15 minutos.

7.8 Formulación de FID-E 10 mg/ml + HBC 40 mg/ml

En un vaso de precipitados de vidrio se pesaron 100 mg de FID-E preparado como se informa en el Ejemplo 1, se agregaron 10 ml de PBS pH 7,0 y se dejó disolver bajo agitación magnética. Luego de su completa disolución, los 10 ml se pasaron a un tubo Falcon de 50 ml, se agregaron 400 mg de HBC y se colocó en estufa a 80 °C por 2 horas, mezclando con una espátula cada 20' aproximadamente. Luego de completado el precalentamiento, se filtró en un prefiltro de 0,5 mm y se repartió en jeringas de vidrio de 3 ml y se esterilizó en autoclave a 121 °C durante 15 minutos.

7.9 Formulación de FID-C8 50 mg/ml

En un tubo Falcon de 50 ml se pesan 1200 mg de FID-C8 preparado como se informa en el Ejemplo 6a; se agregan 24 ml de PBS pH 7,0 y se deja hidratar a temperatura ambiente. Luego de aproximadamente 1 hora, el tubo se coloca en la estufa a 60 °C, mezclando con una espátula aproximadamente cada 20'. Luego de completado el precalentamiento, se filtra en un prefiltro de 0,5 mm y se divide en jeringas de vidrio de 3 ml y se esteriliza en autoclave a 121 °C durante 15 minutos.

7.10 Formulación de FID-C8 30 mg/ml + GEL 20 mg/ml

En un tubo Falcon de 50 ml se pesan 720 mg de FID-C8 preparado como se informa en el Ej. 6a y 480 mg de GEL preparado como se informa en el Ej. 4; se agregan 24 ml de PBS pH 7,0 y se deja hidratar a temperatura ambiente. Después de aproximadamente 1 hora, el tubo se coloca en la estufa a 80 °C, mezclando con una espátula aproximadamente cada 20'. Luego de completado el precalentamiento, se filtra en un prefiltro de 0,5 mm y se divide en jeringas de vidrio de 5 ml y se esteriliza en autoclave a 121 °C durante 15 minutos.

7.11 Formulación de FID-C8 20 mg/ml + GEL 10 mg/ml

En un tubo Falcon de 50 ml se pesan 480 mg de FID-C8 preparado como se informa en el Ej. 6a y 240 mg de GEL preparado como se informa en el Ej. 4; se agregan 24 ml de PBS pH 7,0 y se deja hidratar a temperatura ambiente. Después de aproximadamente 1 hora, el tubo se coloca en la estufa a 80 °C, mezclando con una espátula aproximadamente cada 20'. Luego de completado el precalentamiento, se filtra en un prefiltro de 0,5 mm y se divide en jeringas de vidrio de 3 ml y se esteriliza en autoclave a 121 °C durante 15 minutos.

7.12 Formulación de FID-A 30 mg/ml + HBC 30 mg/ml

En un tubo Falcon de 50 ml se pesan 900 mg de FID-A preparado como se informa en el Ejemplo 3 y 900 mg de HBC en polvo; se agregan 30 ml de PBS pH 7,0 y se deja disolver a temperatura ambiente en un agitador rotatorio. Después de aproximadamente 1 hora, el tubo se coloca en la estufa a 80 °C, mezclando con una espátula aproximadamente cada 20'. Luego de completado el precalentamiento, se filtra en un prefiltro de 0,5 mm y se divide en jeringas de vidrio de 3 ml y se esteriliza en autoclave a 121 °C durante 15 minutos.

7.13 Formulación de FID-A 20 mg/ml + GEL 10 mg/ml + HBC 30 mg/ml

En un tubo Falcon de 50 ml se pesan 600 mg de FID-A preparado como se informa en el Ej. 3, 300 mg de GEL preparado como se informa en el Ej. 4 y 900 mg de HBC en polvo; se agregan 30 ml de PBS pH 7,0 y se deja disolver a temperatura ambiente en un agitador rotatorio. Después de aproximadamente 1 hora, el tubo se coloca en la estufa a 80 °C por aproximadamente 2 horas, mezclando con una espátula aproximadamente cada 20'. Luego de completado el precalentamiento, se filtra en un prefiltro de 0,5 mm y se divide en jeringas de vidrio de 5 ml y se esteriliza en autoclave a 121 °C durante 15 minutos.

7.14 Formulación de FID-A 20 mg/ml + GEL 10 mg/ml + HBC 20 mg/ml

En un tubo Falcon de 50 ml se pesan 600 mg de FID-A preparado como se informa en el Ejemplo 3, 300 mg de GEL preparado como se informa en el Ejemplo 4 y 600 mg de HBC en polvo; se agregan 30 ml de PBS pH 7,0 y se deja disolver a temperatura ambiente en un agitador rotatorio. Después de aproximadamente 1 hora, el tubo se coloca en la estufa a 80 °C durante aproximadamente 2 horas, mezclando con una espátula aproximadamente cada 20'. Luego de completado el precalentamiento, se filtra en un prefiltro de aproximadamente 0.5 mm, se divide en jeringas de vidrio de 3 ml y se esteriliza en autoclave a 121 °C durante 15 minutos.

La caracterización de las biotintas descritas anteriormente se ha realizado evaluando su comportamiento reológico pre- y post-reticulación con el fin de predecir su extrudabilidad y características en las fases de extrusión y post-extrusión, y el comportamiento biológico, es decir, la interacción con especies celulares, en particular con células encapsuladas en la biotinta antes de la extrusión.

El comportamiento reológico pre- y post-reticulación se evalúa examinando diferentes parámetros:

- *viscosidad dinámica* (η) (pre-reticulación): se utiliza un reómetro equipado con un sistema de placa/cono de 1°, aumentando la *velocidad de corte* (la tensión de corte) de 0,01 s⁻¹ a 2000 s⁻¹ a 20 °C y monitoreando la viscosidad dinámica (η) que en un fluido no newtoniano disminuye al aumentar la velocidad de corte. La capacidad del material para fluir después de la aplicación de una tensión se denomina adelgazamiento por cizallamiento y es un parámetro esencial para entender si el material en evaluación tiene las características reológicas de una biotinta. También existe una correlación directa entre el adelgazamiento por cizallamiento y la viabilidad de las células encapsuladas en la biotinta (Townsend JM et al. Progress in Polymer Science 2019, 91:126-140);
- *esfuerzo de fluencia* (pre-reticulación) se define como el valor de *esfuerzo cortante* por encima del cual un material comienza a fluir y por debajo del cual permanece estático. En otras palabras, si es posible medir el esfuerzo de fluencia de un material, es probable que dicho material, una vez impreso, sea capaz de mantener la forma depositada después de la extrusión durante el tiempo necesario para que se produzca la fotoreticulación. Para las biotintas, este tipo de característica es preferente a una alta viscosidad, ya que un material con esfuerzo de fluencia no se deforma con el tiempo, a diferencia de un material de alta viscosidad;
- *módulos viscoelásticos* (post-reticulación): los módulos viscoelásticos (G' : módulo viscoelástico; G'' : módulo de viscosidad) se utilizan en el hidrogel formado después de la reticulación tras la irradiación UV para confirmar la capacidad del hidrogel de polimerizar formando una estructura compacta y capaz de mantener su propia forma.

Pre-reticulación

Las mezclas ensayadas, en forma de hidrogel, son:

FID-E + HYADD®-4 como se informa en el Ejemplo 7.6;
FID-E + GEL como se informa en el Ejemplo 7.3.

Las concentraciones respectivas también se informan para conveniencia en las leyendas de los gráficos representados en las Figuras 4-7 adjuntas.

La evaluación se realizó con un reómetro Anton Paar RheoCompass, equipado con un sistema de placa/cono de 1°, aumentando la velocidad de corte de 0,01 s⁻¹ a 2000 s⁻¹ y monitoreando la viscosidad dinámica (η) a 20 °C, expresada en Pas·s.

Los valores obtenidos para las mezclas probadas están relacionados con los valores correspondientes de la crema Nivea, "estándar de oro" de la impresión (Paxton N et al. Biofabrication 2017, 9, 044107) y de una tinta comercial (*Cellink Start*).

Los gráficos presentados en la Figura 1 resaltan que todas las mezclas probadas tienen un comportamiento de

adelgazamiento por cizallamiento.

Esfuerzo de Fluencia: para las mezclas en evaluación, los valores de esfuerzo de fluencia se midieron con un reómetro equipado con un sistema de placa/cono de 1°, incrementando el esfuerzo cortante de 0,01 Pa a 1000 Pa a 25 °C, y se resumen a continuación.

Tabla 1

Muestra	FID119-E	HYADD®-4	GEL	Esfuerzo de Fluencia (Pa)
Crema Nivea	-	-	-	80
FID-E+ HYADD®-4	10	40	-	73
FID-E + GEL	40	-	20	61

Los valores de esfuerzo de fluencia medidos, muy próximos a los de la crema Nivea, confirman además que las mezclas ensayadas son adecuadas para las aplicaciones de acuerdo con la presente invención.

Se han obtenido resultados comparables, en las mismas condiciones, también para la formulación de FID-A+GEL preparada como se informa en el Ejemplo 7.4, cuyos valores de viscosidad dinámica se informan en la Figura 2.

Post-reticulación

Los hidrogeles FID-E (como se informa en el Ejemplo 7.1) y FID-A (como se informa en el Ejemplo 7.2) han sido irradiados con UV (λ_{max} : 365 nm) durante 30 s a PWR 100 (Dymax BlueWave QX4; *intensidad de salida* 13,9 W/cm², *sin lente de enfoque*). Los módulos de viscosidad y elasticidad (G'; G'') han sido evaluados con un reómetro Anton Paar RheoCompass equipado con placa/placa paralela (*espacio libre* 0,3 mm, *esfuerzo* 10% y ω de 0,1 a 100 rad/s). El gráfico informado en la Figura 3 demuestra que ocurre la transición de solución a gel, lo que resulta en la formación de estructuras compactas y sólidas. El mismo experimento repetido para FID-E + HYADD®-4 demuestra que, como se esperaba, la adición de un derivado adicional de HA mejora significativamente las propiedades reológicas posteriores a la reticulación (Figura 4).

Para confirmar que las características viscoelásticas de los hidrogeles ensayados son adecuadas para las aplicaciones de acuerdo con la presente invención, se ha realizado una prueba de impresión, que se describe a continuación:

3 ml de la fórmula FID-E + HYADD®-4 preparada como se informa en el Ejemplo 7.6 se han transferido a un cartucho para impresora 3D (BIO X™ - Cellink) y se ha impreso una red de tamaño 3 × 3 cm (Figura 5); al final de la deposición de cada capa (capa) el material ha sido irradiado a 365 nm durante 15 segundos (Figura 6), antes de depositar la siguiente capa. La impresión se considera completada después de la deposición de un total de 4 capas. Al finalizar el proceso, se ha obtenido una red compacta, manejable y que es capaz de mantener de forma estable la forma adquirida después de la irradiación (Figura 7).

El comportamiento biológico evalúa las interacciones *in vitro* de los hidrogeles con especies celulares, en términos de viabilidad celular post-reticulación.

Se probaron los siguientes:

FID-E: éster de HA-TEG-Umbeliferona, formulado como en el Ejemplo 7.1;
FID-A: amida de HA-TEG-Umbeliferona, formulada como en el Ejemplo 7.2;

Viabilidad celular después de la encapsulación en hidrogel y reticulación.

La viabilidad celular de fibroblastos murinos (clon BALB/3T3 A31, ATCC CCL-163) encapsulados en hidrogel de la especie en estudio se evaluó mediante ensayos *in vitro* a los 6 días. Los fibroblastos murinos se cultivaron en medio DMEM (Gibco, cat. no. 41965-039, Italia) conteniendo suero bovino fetal al 10% (Life Technologies, cat. no. 10270106, Italia) en condiciones estándar (37 °C, 5% CO₂) hasta alcanzar una confluencia del 80%.

Las células se resuspendieron a continuación a una concentración igual a 7,5×10⁵ células/ml en soluciones de los hidrogeles seleccionados; se pipetearon 300 µl de dichas suspensiones celulares (2,25×10⁵ células) en cada pocillo de placas Multiwell de 24 pocillos (Sarstedt, cat. no. 83.3922, Alemania) y se reticularon durante 10 s con una lámpara UV a 365 nm (DYMAX, EE. UU.). Posteriormente, se añadió a cada pocillo 1 ml de medio DMEM que contenía suero bovino fetal al 10% (Life Technologies, cat. no. 10270106, Italia) (Gibco, cat. no. 41965-039, Italia) y las placas se incubaron en condiciones estándar (37 °C, 5% de CO₂). Las condiciones experimentales

probadas se dividieron en tres grupos:

- 1) un grupo de control, en el que las células fueron sembradas directamente en el pocillo de la placa (2,25×10⁵ células);
- 2) un grupo en el que las células fueron encapsuladas en hidrogel FID-E, 40 mg/ml;
- 3) un grupo en el que las células fueron encapsuladas en hidrogel FID-A, 40 mg/ml.

Cada condición se probó por triplicado.

El día anterior al *punto de tiempo* predeterminado, los hidrogeles se incubaron en condiciones estándar (37 °C, 5% de CO₂) con la enzima hialuronidasa (52000 UI - Fidia, Italia) para disolverlos y permitir que los fibroblastos se adhirieran al fondo del pocillo. Al final de los tiempos de incubación predeterminados, se cuantificó la viabilidad celular mediante el ensayo Alamar blue® (Life Technologies, cat. no. DAL1025, Italia), de acuerdo con las instrucciones proporcionadas por el fabricante, para determinar la actividad metabólica de los fibroblastos de ratón, realizada a nivel mitocondrial. Los datos proporcionados en la Figura 8 se han normalizado con respecto al control; de su análisis es evidente que tanto FID-E como FID-A registraron un porcentaje óptimo de viabilidad de fibroblastos murinos después de la encapsulación, superior al 80%, con mejores porcentajes para el derivado de amida (FID-A).

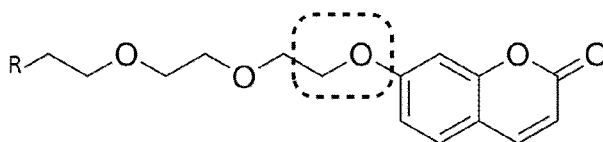
Tal resultado resalta que el proceso de encapsulación y reticulación de los hidrogeles no compromete la viabilidad celular; el constructo obtenido para la reticulación de biotintas de acuerdo con la presente invención está por lo tanto poblado de células viables, proliferando así, siendo así capaz de actuar como un verdadero sustituto de tejido u órgano vivo.

REIVINDICACIONES

1. Uso de una biotinta para impresión 3D, comprendiendo dicha biotinta un conjugado fotorreticulable de ácido hialurónico y un enlazador fotorreactivo bifuncional, o un conjugado fotorreticulable de gelatina y un enlazador fotorreactivo bifuncional, o mezclas de los dos conjugados fotorreticulables,

en el que el enlazador fotorreactivo bifuncional es un enlazador de cumarina, que consiste en un residuo de umbeliferona, unido a un espaciador,

en el que en el conjugado fotorreticulable de gelatina el espaciador es trietilenglicol, teniendo el enlazador la siguiente fórmula (I):

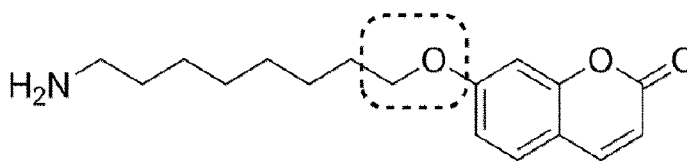


(I)

en la que:

R = - NH₂ para la formación de un enlace amida;

o en el que en el conjugado fotorreticulable de ácido hialurónico el espaciador es una cadena lineal de alquilo C4-C20, preferentemente una cadena de alquilo C8-C16, incluso más preferentemente una cadena de octilo o una cadena de dodecilo, teniendo el enlazador la siguiente fórmula (II):



(II)

el enlace entre el enlazador fotorreactivo bifuncional y el ácido hialurónico o la gelatina es un enlace amida.

2. Uso de una biotinta de acuerdo con la reivindicación 1, en el que la gelatina es de origen bovino tipo B y tiene aproximadamente 225 g de Bloom.
3. Uso de una biotinta de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que el ácido hialurónico es producido y purificado por *Streptococcus* o *Bacillus*, preferentemente *Streptococcus*, que tiene un PM promedio ponderal comprendido entre 100.000 y 250.000 Da, preferentemente entre 180.000 y 230.000 Da, o que tiene un PM promedio ponderal comprendido entre 500.000 y 730.000 Da.
4. Uso de una biotinta de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en la que el conjugado fotorreticulable de ácido hialurónico y enlazador fotorreactivo bifuncional, consiste en ácido hialurónico y enlazador fotorreactivo bifuncional conjugados por enlace amida, consistiendo dicho enlazador en umbeliferona unida a un espaciador de cadena lineal de octilo o cadena dodecilo, siendo preferentemente el ácido hialurónico de partida preparado y purificado por *Streptococcus* y teniendo un PM promedio ponderal comprendido entre 100.000 y 250.000 Da, preferentemente entre 180.000 y 230.000 Da.
5. Uso de una biotinta de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que el conjugado fotorreticulable de gelatina y enlazador fotorreactivo bifuncional, consiste en gelatina y enlazador fotorreactivo bifuncional conjugados mediante enlace amida, consistiendo dicho enlazador en umbeliferona unida a un espaciador de trietilenglicol.
6. Uso de una biotinta de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, comprendiendo dicha biotinta además material celular y/o componentes adicionales seleccionados entre los siguientes derivados del ácido hialurónico:
- derivados de amida alifática, preferentemente la hexadecilamida preparada a partir de un HA con un peso molecular promedio ponderal comprendido entre 500 kDa y 730 kDa, y que tiene un grado

promedio de amidación comprendido entre 0,1% y 10% molar, preferentemente comprendido entre 1% y 3% molar, más preferentemente la hexadecilamida con un grado promedio de derivatización comprendido entre 1% y 3% molar (HYADD®-4);

• ésteres internos autorreticulados con un porcentaje de esterificación no superior al 20%, preferentemente entre 0,05 y 10% (ACP®);

• derivados reticulados, obtenidos mediante el uso de agentes reticulantes tales como BDDE (1,4-Butanediol diglicil éter), con un grado de derivatización entre 2,5 y 25% molar, preferentemente entre 5 y 15% molar con respecto a la unidad repetitiva del ácido hialurónico, y preparados a partir de HA con un peso molecular promedio ponderal comprendido entre 500 y 730 kDa (HBC).

7. Uso de una biotinta de acuerdo con la reivindicación anterior, en el que los componentes adicionales se seleccionan entre HYADD®-4 o HBC.

8. Uso de una biotinta de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, que comprende:

• conjugado de HA con el enlazador fotorreactivo bifuncional a través del enlace amida como se describió previamente, en concentraciones que varían de 20 a 60 mg/ml, preferentemente comprendidas entre 30 y 50 mg/ml, aún más preferentemente iguales a 40 mg/ml;

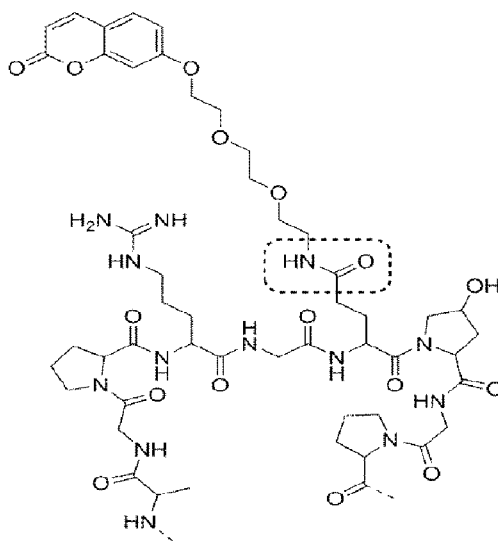
• gelatina conjugada con el enlazador fotorreactivo bifuncional a través de enlace amida, en concentraciones que varían de 20 a 60 mg/ml, preferentemente comprendidas entre 30 y 50 mg/ml, aún más preferentemente iguales a 40 mg/ml;

• mezclas de conjugado de HA y conjugado de gelatina, de composición variable en relación con el material a producir, estando la concentración total de los dos componentes en las mezclas comprendida entre 30 y 80 mg/ml, preferentemente entre 30 y 70 mg/ml, y estando más preferentemente comprendida entre 30 y 60 mg/ml; preferentemente, con respecto a la concentración total mencionada anteriormente, la concentración del conjugado de gelatina está comprendida entre 10 y 30 mg/ml, más preferentemente entre 15 y 30 mg/ml, y aún más preferentemente es igual a 20 mg/ml;

• mezclas con HBC, HYADD®-4, ACP®, seleccionándose dicho polímero adicional entre HBC, HYADD®-4, ACP® mezclándose en una proporción que varía de 1:1 a 5:1, preferentemente de 3:1 a 4:1 con el conjugado de HA o con el conjugado de gelatina, más preferentemente, cuando el polímero adicional es HBC, la proporción es 1:1, variando la concentración total de los componentes que forman las mezclas de 20 a 80 mg/ml, preferentemente de 40 a 70 mg/ml, más preferentemente de 40 a 60 mg/ml y aún más preferentemente de 40 a 50 mg/ml.

9. Uso de la biotinta de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, para la fabricación de constructos mediante impresión 3D.

10. Conjugado de gelatina y un enlazador fotorreactivo bifuncional unido a través de un enlace amida, consistiendo dicho enlazador en umbeliferona y un espaciador de trietilenglicol unido a través de un enlace éter, siendo dicho conjugado reticulable y teniendo la estructura de fórmula (III):



(III)

11. Proceso de preparación de un enlazador fotorreactivo bifuncional que consiste en umbeliferona unida a través de un enlace éter:

• a una cadena de trietilenglicol, siendo dicho enlazador capaz de unirse a la gelatina a través de la formación de un enlace amida y formando así el conjugado de gelatina fotorreticulable,

o

• a una cadena lineal de alquilo C4-C20, preferentemente una cadena de alquilo C8-C16, incluso más preferentemente una cadena de octilo o una cadena de dodecilo, siendo dicho enlazador capaz de unirse a HA a través de la formación de un enlace amida y formando así el conjugado de HA fotorreticulable,

dicho proceso comprende las siguientes etapas:

i) eterificación de la umbeliferona con N-BOC-2-[(2-p-tosiloxietoxi)etoxi]etilamina o con 8-((terc-butoxicarbonil)amino)(alquilo C4-C20) 4-metilbencenosulfonato, en presencia de acetona y carbonato de potasio;

ii) reacción de desprotección del grupo amina a temperatura ambiente.

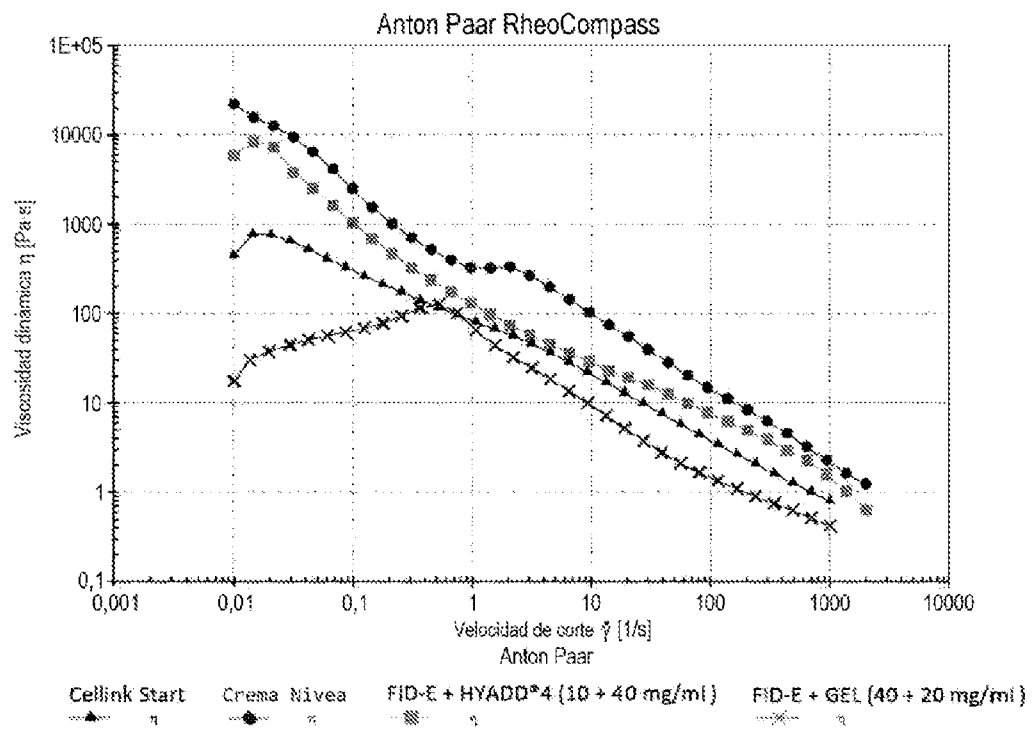


Figura 1. Medición de la viscosidad dinámica η

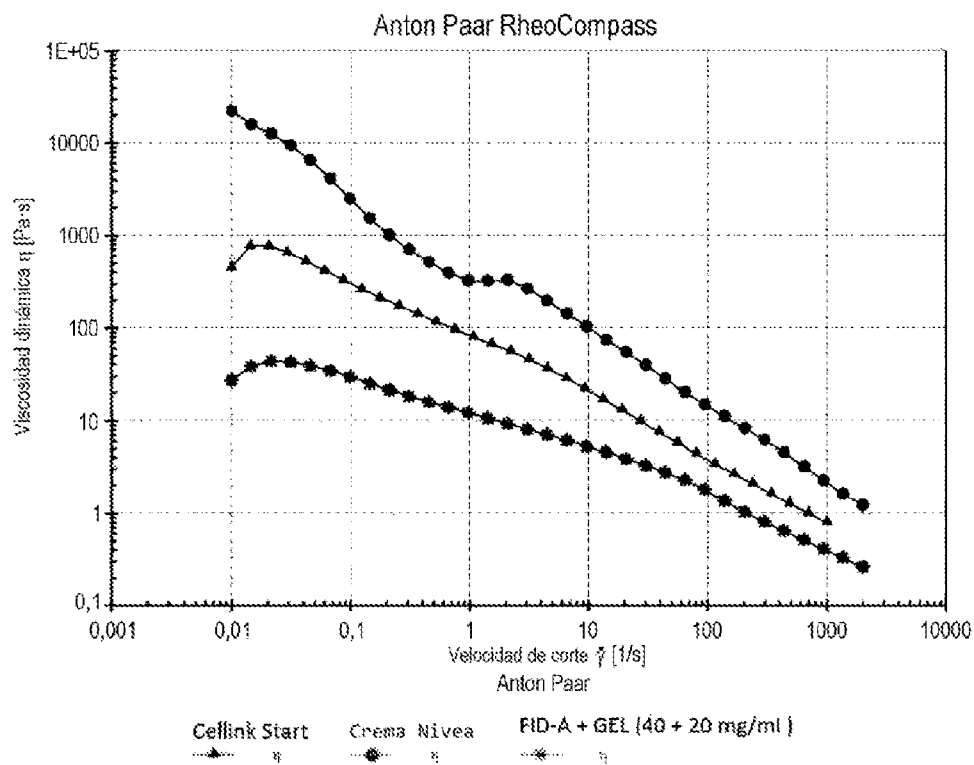


Figura 2. Medición de la viscosidad dinámica η

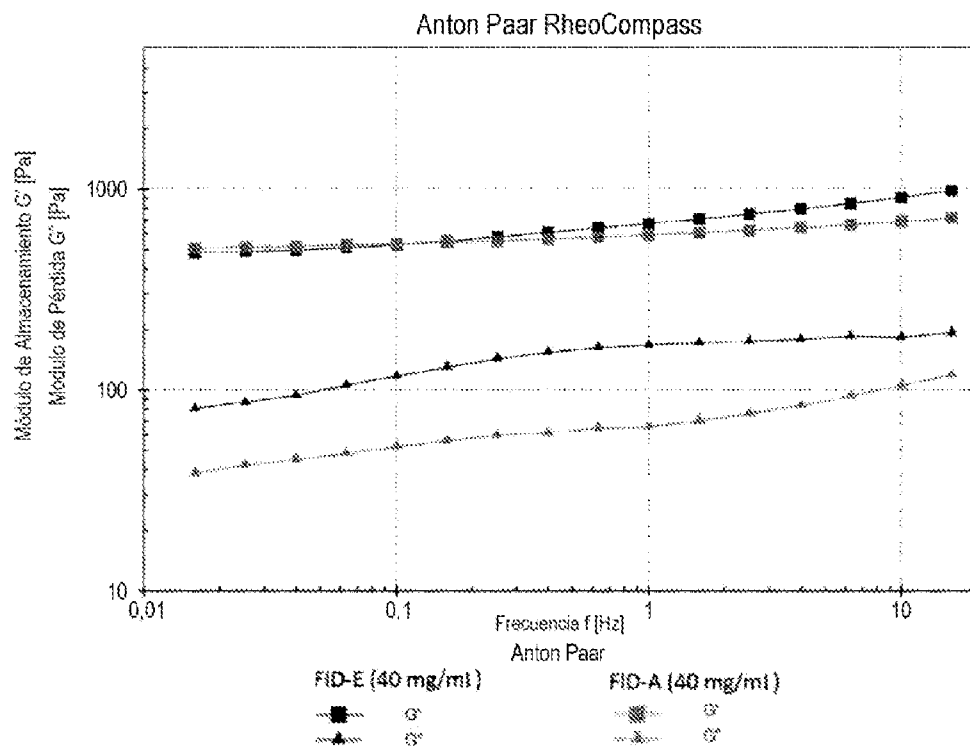


Figura 3. Evaluación de los módulos viscoso y elástico (G' ; G'')

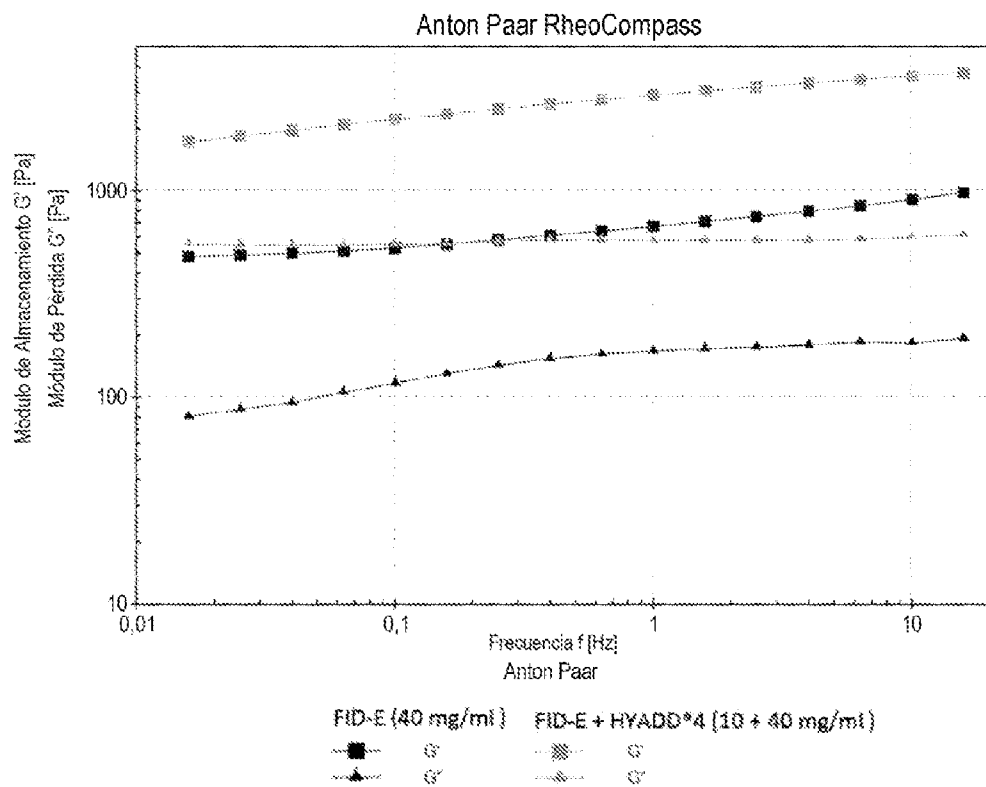


Figura 4. Evaluación de los módulos viscoso y elástico (G' ; G'')

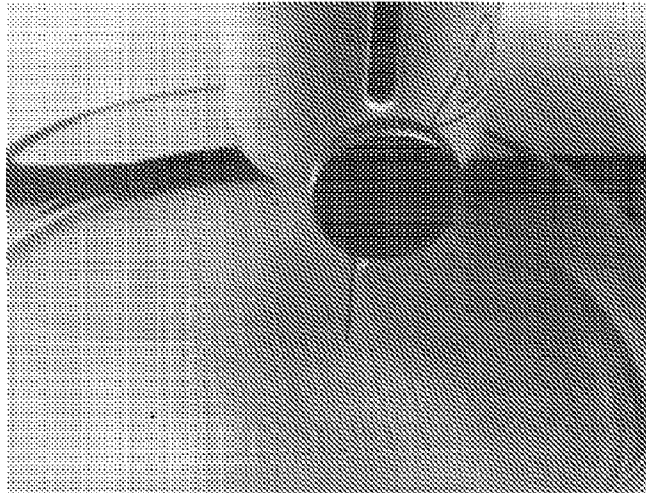


Figura 5. Deposición de la primera capa

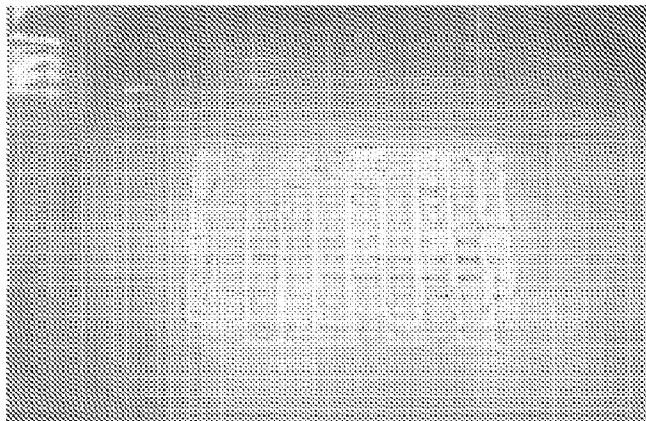


Figura 6. Reticulación por irradiación a 365 nm

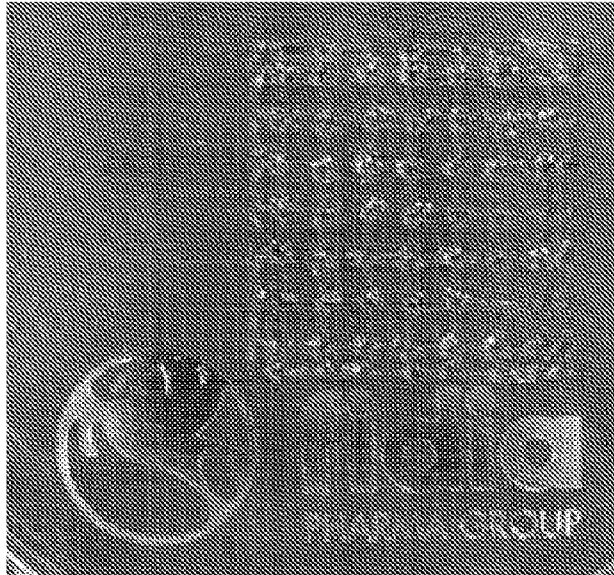


Figura 7. Entramado impreso y reticulado (4 capas)

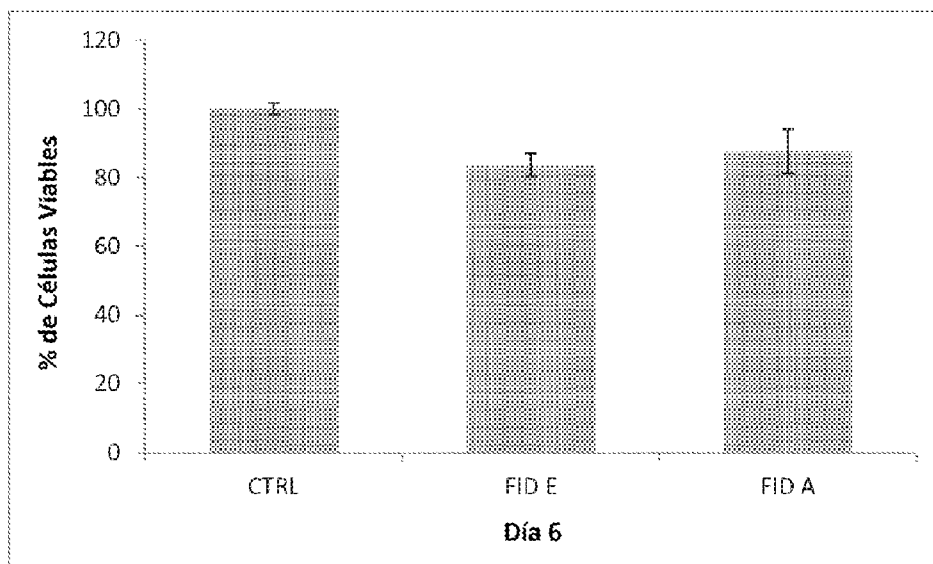


Figura 8. Viabilidad de células 3T3 después de la encapsulación