

## TINTA DE COLÁGENO PARA IMPRESIÓN EN 3D

### DESCRIPCIÓN

5 La presente invención se refiere a una tinta de colágeno para la impresión en 3D. La presente invención también se refiere al método de obtención de la tinta y a los usos dados a la misma.

#### Antecedentes de la invención

10

La impresión 3D es una técnica muy utilizada en el área de la biología y la medicina donde se obtienen estructuras biológicas para prestar un servicio a la medicina regenerativa y a estudios biológicos.

15

Las tintas para poder ser utilizadas en impresión 3D, deben de tener unas propiedades físicas adecuadas en cuanto a, por ejemplo, viscosidad, elasticidad, porosidad y firmeza, pero también deben ser compatibles con diferentes aplicaciones como el desarrollo de tejidos, por lo que deben poseer unas características biológicas adecuadas para ello. La tinta debe ser lo suficientemente fluida para facilitar la extrusión a través de la boquilla de la impresora y la estructura impresa debe de mantenerse íntegra en el tiempo a pH fisiológico.

20

Ejemplos de materiales utilizados en tintas para aplicaciones biológicas son alginatos, fibrinas y colágeno.

25

30

El colágeno es una de las proteínas más abundantes en la naturaleza y es el responsable de mantener la integridad estructural de los tejidos. El colágeno es el material más utilizado en aplicaciones con células ya que es el componente más abundante en la matriz extracelular; este material se utiliza por ejemplo como matriz de apoyo para ayudar al crecimiento celular. Las fibras de colágeno tienen unas secuencias de aminoácidos determinadas, las cuales permiten que las células puedan adherirse y proliferar. Las matrices de colágeno son muy útiles y han producido varios avances biológicos importante, sin embargo, no ha sido desarrollada una matriz conformada por 100% de colágeno que sea óptima. Las

composiciones conformadas solo por colágeno son a partir de colágeno soluble y no suelen tener la consistencia y firmeza suficiente para ser utilizadas como tintas que mantengan la integridad de la estructura impresa sin ayuda de agentes reticulantes o no presentan una configuración nativa.

5

En el caso del colágeno para que presente la viscosidad y firmeza suficiente para ser utilizado como tinta se puede presentar en forma de hidrogel. Un ejemplo de esto se encuentra en la patente con número de publicación CN106581753 que describe un hidrogel biológico para la impresión 3D de una matriz para el crecimiento de tejido dérmico. El hidrogel comprende de 1%-15% de celulosa nanocristalina, 65%-98% de colágeno y 0.01%-20% de un agente de reticulación. Este tipo de hidrogeles tienen la viscosidad adecuada para ser utilizado como tintas, pero el constructo que se obtiene con ella pierde su integridad si no se añade un agente reticulante al colágeno para que puedan realizar su función.

15

Para dar al colágeno las características necesarias para ser utilizado como una tinta de impresión 3D en aplicaciones biológicas se ha utilizado la estrategia de funcionalizar el colágeno. Un ejemplo es la patente con número de publicación CN106237383 que describe microfilamentos de colágeno funcionalizados con un factor de crecimiento que promueve el crecimiento y la diferenciación celular. En este caso se hace además una clasificación y selección previa de las fibras obteniéndose fibras de muy pequeño tamaño, ajustando dicho tamaño para que sea menor del diámetro de la aguja de la cabeza de extrusión (por ejemplo, una aguja de 27G, tiene un diámetro interno de 210µm), se parte de un colágeno soluble extraído mediante con tensioactivos como SDS y tritón y además éste se modifica con otra molécula para obtener resultados óptimos. No se indica además datos reológicos ni de la firmeza de la tinta conseguida, ni de su imprimibilidad ni de la integridad de los constructos obtenidos. En dicha patente se seleccionan fibras de 100, 75, 38 y llegando hasta 25µm.

25

Otras estrategias que se han utilizado para la producción de matrices de colágeno para la impresión 3D son la impresión criogénica que permite la deposición de una solución de colágeno de baja viscosidad a temperaturas bajo cero y realizando el entrecruzamiento in situ.

30

Los métodos de extracción y purificación aplicados actualmente para procesar el colágeno reducen notablemente su densidad de reticulación con el consiguiente impacto en las propiedades relevantes y la respuesta biológica.

5 Por lo tanto, por lo que se desprende del estado de la técnica es necesario el desarrollo de tintas en base a colágeno fibrilar, que no se haya desnaturalizado y que tenga la consistencia y firmeza suficiente para ser utilizadas como tintas en la impresión 3D sin ayuda de agentes reticulantes.

## 10 Descripción de la invención

El colágeno es la proteína más abundante dentro de la matriz extracelular de los tejidos conectivos tales como piel, hueso, cartilago y tendón de los mamíferos y comprende más del 90% de su peso seco.

15 La unidad esencial del colágeno está constituida por tres cadenas de polipéptidos que aparecen entrelazadas formando una triple hélice, constituyendo una unidad macromolecular denominada tropocolágeno. Las moléculas de tropocolágeno se agrupan entre sí constituyendo fibras de colágeno.

20 En la presente invención se ha desarrollado una tinta de colágeno para impresión 3D con una viscosidad adecuada para poder ser utilizada en las impresoras 3D y manteniendo el colágeno en su estado nativo. La tinta de la invención se caracteriza por ser una dispersión de fibras de colágeno nativo en medio acuoso ácido.

25 El medio ácido permite que el colágeno absorba agua y da lugar a un fluido extruible.

30 Por lo tanto, un primer aspecto de la invención se refiere a una tinta de colágeno para la impresión 3D que comprende una dispersión de fibras de colágeno nativo en medio ácido en una concentración en peso comprendida entre el 0,1% y el 10% con un pH entre 0,5 y 5, que presenta una viscosidad comprendida entre 10 centipoises (cP) y 50 millones de centipoises (McP) (método Brookfield a una temperatura entre 18°C y 22°C) y donde la dispersión de fibras comprende fibras cuyo longitud, medida a un pH entre 1 y 2, se encuentra en un rango de 1 µm a 2500µm y su diámetro en un

rango de 0.1µm a 180µm.

- 5 Las fibras en la tinta de la invención presentan un amplio rango de longitudes y diámetros y no es necesaria una clasificación para obtener y seleccionar las fibras de tamaño pequeño de la tinta. La tinta es imprimible a pesar de que puede tener un elevado porcentaje de su masa con fibras de elevado tamaño, con fibras mayores de 1 mm de longitud y con diámetros que pueden ser superiores al diámetro interno de la cabeza de extrusión de la impresora, por ejemplo, 22G= 152µm.
- 10 La fibra de colágeno de la invención mantiene la estructura molecular de triple hélice sin desnaturalizarse. La fibra puede absorber agua e hincharse, con diámetros que se encuentran principalmente entre 5µm y 35µm, mientras que dichas fibras estarían ausentes en caso de desnaturalización e hidrólisis.
- 15 Como hemos mencionado la molécula de colágeno es una molécula alargada constituida por tres cadenas polipeptídicas enrolladas entre sí constituyendo una triple hélice estabilizada por interacciones o enlaces por puente de hidrógeno, esto es la estructura del colágeno nativo. Cuando el colágeno se desnaturaliza por ejemplo calentándolo en presencia de agua o calentándolo a valores de pH extremos
- 20 se separan dichas cadenas y disuelven formando una gelatina. La formación de la gelatina se debe a la ruptura de los enlaces de hidrogeno que estabilizan la triple hélice de colágeno, el proceso de transformación de colágeno en gelatina es considerado un proceso típico de desnaturalización. En la presente dispersión de fibras de colágeno no hay gelatina o no es significativa su presencia.
- 25 En la presente descripción se entiende por “colágeno nativo” al colágeno que no ha sido desnaturalizado, hidrolizado o gelatinizado, totalmente o significativamente.
- 30 La tinta de la invención se presenta en forma de una dispersión en medio ácido de colágeno nativo fibrilar de tamaño optimizado, obtenido a partir de una fuente biológica de colágeno, normalmente consistente en grandes haces y/o agregados fibrilares sometida a tratamientos que, preservando la estructura nativa, desencadenan la desintegración en fibras de menor diámetro y longitud las cuales permiten formular fluidos con las características reológicas idóneas para una correcta

impresión 3D.

5 Las estructuras que se obtienen con la tinta de la invención mediante impresión 3D son estructuras estables y resistentes de colágeno fibroso no soluble y nativo, sin necesidad de utilizar reticulantes.

10 Es importante que la tinta comprenda colágeno nativo ya que en el medio natural el colágeno no es sólo una proteína estructural y de soporte, sino que interactúa específicamente con otras biomoléculas, media en la adhesión celular y guía funciones celulares. En la medida que la tinta de la invención conserve la estructura nativa, cuando la tinta se utilice en impresiones para aplicaciones biomédicas podrá mantener sus características en relación con sus funciones fisiológicas.

15 Igualmente, la invención se refiere a cualquier hidrogel que comprenda la tinta descrita en el primer aspecto de la invención y en las materializaciones descritas más adelante.

Un segundo aspecto de la invención es el procedimiento de obtención de la tinta de colágeno que comprende las etapas de:

- 20 a) lavar, y trocear un tejido que contiene el colágeno;  
b) macerar químicamente el tejido troceado;  
c) lavar con agua el producto obtenido de la etapa b);  
d) ajustar el pH del producto lado obtenido en c), a valores entre 0,5 y 5 para hinchar el producto lado de la etapa c):  
25 e) picar mecánicamente el producto de la etapa d);  
f) dispersar en agua hasta una concentración en peso preferiblemente entre el 0,1% y el 10%.

30 La matriz de colágeno presenta baja inmunogenicidad, buena biocompatibilidad y biodegradabilidad, interactúa específicamente con otras biomoléculas, contiene secuencias específicas que median la regulación de la morfología, adhesión, migración y diferenciación de células. La tinta de la invención tiene la viscosidad adecuada para pasar por la boquilla de impresión 3D.

Por lo tanto, el tercer aspecto de la invención se refiere al uso de la tinta de la invención en la impresión 3D. Igualmente se describe en la presente invención el procedimiento de impresión con la tinta descrita más arriba y en cualquiera de sus materializaciones.

5

El cuarto aspecto de la invención se refiere a la estructura que comprende la tinta de la invención. Una de las ventajas de esta estructura es que es altamente biocompatible y reabsorbible.

10

#### **Breve descripción de los dibujos**

La Figura 1 muestra una malla impresa con la tinta de la invención a modo de andamio biodegradable para el cultivo de células.

15

La Figura 2 muestra el cultivo de las mallas con fibroblastos de células embrionarias murinas en la malla de la Figura 1 tras dos días de cultivo obtenidas a día 2 (10X).

La Figura 3 muestra el cultivo en el día 5.

20

La Figura 4 muestra el cultivo en el día sexto de desarrollo.

La Figura 5 muestra el gráfico de barrido de esfuerzo de las muestras 531-010, 531-020.

25

La Figura 6 muestra el gráfico de barrido de esfuerzo de las muestras 431-010, 431-020.

La Figura 7 muestra el constructo impreso con la tinta de la invención.

30

Las Figuras 8A-8F muestran diferentes construcciones realizadas con la tinta. Las figuras 8B, 431-010 y 8F corresponden a los constructos A, C y E tras neutralizar y ajustar a pH fisiológico (pH 7,4).

La Figura 9 y 9B muestra imágenes por microscopía óptica de partículas individuales de la tinta de la invención 531-010 diluida al 0.1% y teñidas con Sirius

Red.

La Figura 10 muestra el elemento impreso con la tinta del ejemplo 8.

## 5 Descripción de una realización preferida

10 Como se ha comentado más arriba el primer aspecto de la invención se refiere a una tinta de colágeno para la impresión 3D que comprende una dispersión de fibras de colágeno nativo en medio ácido en una concentración comprendida entre el 0,1% y el 10% con un pH entre 0,5 y 5, que presenta una viscosidad comprendida entre 10 cP y 50 McP (según método Brookfield descrito en Ejemplo 3 y a una temperatura entre 18°C y 22°C,) y donde la dispersión de fibras comprende fibras cuyo longitud, medida a un pH entre 1 y 2, se encuentra en un rango de 1µm a 2500µm y su diámetro en un rango de 0.1µm a 180µm.

15 De manera preferente el 90% de la masa de fibras de colágeno de la dispersión comprende fibras cuya longitud se encuentra en un rango de 50µm a 2500µm.

20 De manera preferente el 75% de la masa de fibras de colágeno de la dispersión comprende fibras cuya longitud se encuentra en un rango de 50µm a 1000µm y el 50% entre 100 µm y 500 µm.

De manera preferente el 80% de la masa de fibras de colágeno comprende fibras cuyo diámetro se encuentra comprendido entre 5µm y 35µm.

25 De manera preferente la concentración está comprendida entre el 1% y el 5%.  
De manera preferente el pH se encuentra comprendido entre pH 1 y 3.

De manera preferente la viscosidad está comprendida entre 2 McP y 15 McP.

30 Una característica de las matrices de colágeno de la invención es la integridad de la misma tras neutralizarla hasta pH fisiológico.

Una característica de las matrices de colágeno de la invención es la integridad de la

misma tras neutralizarla hasta pH fisiológico. Entre las posibles aplicaciones de la tinta de la invención se encuentra la impresión de matrices para el cultivo celular y de tejidos. En ese caso es muy ventajoso que el colágeno sea nativo ya que de esta manera se asemeja más a la estructura original del colágeno replicando con mayor semejanza el entorno original en el que tiene lugar la proliferación celular en el organismo. Sorprendentemente, el constructo o matriz obtenida es lo suficientemente rígido para mantenerse íntegro y firme en el tiempo a pH fisiológico. Preferentemente la tinta que se utiliza en estas aplicaciones comprende una dispersión de fibras de colágeno nativo en medio ácido en una concentración comprendida entre el 2% y el 5% con un pH entre 1 y 3.

Un uso preferente de la tinta descrita en el párrafo anterior es la construcción de matrices para el cultivo de células y tejidos.

Como se ha dicho el segundo aspecto de la invención se refiere al procedimiento de obtención de la tinta de la invención a partir de un tejido con contenido en colágeno que comprende las etapas de:

- a) lavar, y trocear un tejido que contiene el colágeno;
- b) macerar químicamente de manera controlada el tejido troceado;
- c) lavar con agua el producto obtenido de la etapa b);
- d) ajustar el pH del producto lado obtenido en c), a valores entre 0,5 y 5 para hinchar el producto lado de la etapa c);
- e) picar mecánicamente el producto de la etapa d);
- f) dispersar en agua hasta una concentración preferiblemente entre el 0,1% y el 10%.

De manera preferente el tejido que contiene colágeno es tejido conectivo. De manera preferente el tejido conectivo se selecciona entre: dermis, hueso, tendón, cartilago, intestino. De manera preferente el tejido conectivo es tejido de dermis y más preferentemente el colágeno se extrae de la capa denominada corium.

En cuanto al origen del tejido conectivo, este puede provenir de cualquier fuente animal. En una realización particular el tejido conectivo es de origen bovino, ovino, porcino, aviar, de pescado o una mezcla de los mismos. De una manera preferida, el

tejido conectivo es de origen bovino y de un animal de una edad superior al año. Preferentemente entre 1 y 3 años.

5 Más preferentemente antes de la etapa a) cuando el tejido conectivo es la dermis, ésta se depila y blanquea. De manera preferente junto a la etapa a) de lavado se realiza una etapa de blanqueamiento con agentes oxidantes débiles. Un ejemplo de agente oxidante débil es el peróxido de hidrógeno diluido.

10 De manera preferente la etapa b) se realiza en presencia de un agente alcalino por ejemplo hidróxido de calcio, hidróxido de sodio, en presencia o en ausencia de enzimas. De manera particular la etapa b) se realiza con sales de sulfuro y tratamientos alcalinos, como por ejemplo  $\text{Na}_2\text{S}$  y  $\text{Ca}(\text{OH})_2$ .

15 De manera preferente los ácidos utilizados para acidificar en la etapa d) se seleccionan entre: clorhídrico, láctico, acético, cítrico. Preferentemente se acidifica hasta pH entre 1 y 3.

20 De manera preferente la etapa f) de preparar una dispersión acuosa de colágeno fibroso se realiza a una concentración comprendida entre el 1% y el 5%. Más preferentemente entre el 2% y el 5%.

25 De manera particular se prefiere someter la dispersión obtenida en la etapa f) a un proceso de homogenización mecánica consistente en someter la dispersión a una fuerza de cizalla haciéndolo pasar por una rendija a alta presión, preferiblemente a una presión mínima de 50 atmósferas. Preferentemente entre 50 atm y 100 atm.

30 En el Ejemplo 3 y en las Figuras 5 y 6, se muestra que el proceso de homogenización provoca un cambio en la reología de la tinta de la invención. La masa homogeneizada es capaz de soportar más esfuerzo sin perder su estructura. El valor del módulo elástico ( $G'$ ) de la masa de colágeno se mantiene constante al aplicar mayores fuerzas de deformación que en el caso de la masa no homogeneizada.

La presente invención también se refiere al producto obtenido por el procedimiento de la invención y por todas sus materializaciones descritas en los párrafos anteriores.

El procedimiento de impresión con la tinta de la invención tiene diferentes materializaciones.

5 En una materialización del procedimiento de impresión, la tinta se mezcla con células que de manera particular se seleccionan entre: astrocitos, cardiomiocitos embrionarios, cardiomiocitos fetales, cardiomiocitos neonatales, cardiomiocitos, miocitos ventriculares embrionarios, células endoteliales de la córnea, células epiteliales de la córnea, células epiteliales del pigmento del iris, células epiteliales pigmentarias de la retina, células neuronales de dopamina fetal, células neuronales  
10 neocorticales fetales, células neuronales entéricas, hepatocitos, células madre mesenquimales de tejido adiposo, células madre mesenquimales de la médula ósea, osteoblastos, condrocitos, células pancreáticas, células uroteliales.

15 En otra materialización del procedimiento de impresión antes de la impresión la tinta se neutraliza a un pH comprendido preferentemente entre 7 y 8, de manera particular se neutraliza con sales o tampones seleccionado entre: tampón fosfato salino (PBS 1X y 10X), Tricina, MOPS (ácido 3-(n-morfolino) propanesulfónico, HEPES (ácido 4-2(hidroxietil)piperazin-1-iletanosulfónico), tris, carbonato sódico.

## 20 EJEMPLOS

Los siguientes ejemplos tienen únicamente carácter ilustrativo de esta invención, y no deben ser interpretados en sentido limitativo de la misma.

### 25 Ejemplo 1

Para preparar la tinta de la invención se parte de piel bovina de animal de 18-26 meses que se somete a un proceso estándar de depilación (p.ej. con una sal de sulfuro como  $\text{Na}_2\text{S}$ ).

30 A continuación, se divide la piel y se extrae la dermis de donde se obtiene el colágeno.

Tras varios lavados con agua y blanqueado con un agente oxidante blando (por ejemplo, peróxido de hidrógeno diluido), se lima el material con hidróxido de calcio

5 en las condiciones de tiempo y temperatura que el material precise para su adecuada maceración. A continuación se vuelve a lavar con agua los restos de reactivo y se acidifica con HCl concentrado (33%). Se pica con ayuda de un grinder y se diluye con agua hasta obtener una dispersión de colágeno en agua al 2.9% en colágeno. El pH resultante es 3,1.

### Ejemplo 2

10 La dispersión del Ejemplo 1, se imprimió una matriz con forma de malla (5X2.5 cm y 1.2 mm de tamaño de poro) con una impresora 3D a una velocidad de 3 mm/s usando una cabeza de extrusión de aguja con nozzle 24G en una placa de Petri de 10 cm, a modo de andamio como sustrato para el cultivo celular.

15 Una vez se imprimió la malla, se sumergió en NaOH 50 mM hasta cubrir la malla para elevar el pH y así provocar que el colágeno coagule. Una vez coaguló se lavó con solución tampón de fosfato (PBS) a pH 7,4 en cantidad suficiente para cubrir la malla y posteriormente se sumergió en medio de cultivo enriquecido con antibióticos. Es de destacar que esta dispersión de la invención se imprime y se coagula a temperatura ambiente y sin añadir reticulantes.

20 Se cultivaron fibroblastos de células embrionicas murinas en la malla. Se re suspendieron un total de 300.000 células.

25 En la Figura 2 se muestra el cultivo de las mallas con fibroblastos obtenidas a los 2 días. En la Figura 3 se muestra el cultivo al quinto día. La placa de cultivo está a una confluencia del 100% y se empiezan a observar tactismos y crecimiento dirigido de las células con el material. La Figura 4 muestra el cultivo al sexto día de desarrollo. Algunas células crecen siguiendo la dirección de las fibras de colágeno de la malla.

### 30 Ejemplo 3 Reología de la tinta

Para ello se utilizó un Reómetro de esfuerzo controlado "Modulate Advanced Rheometer System" MARS 40 (Thermo Haake) equipado con un rotor placa-placa de 20mm. Se realizó un ensayo oscilatorio de barrido de esfuerzos en un rango de

esfuerzo ( $\tau$ ) 1 Pa a 15000Pa a una frecuencia fija de 1Hz manteniendo una distancia entre platos de 0,8 mm a una temperatura de medida 15,0°C. Previamente al ensayo se dejó atemperar durante 10 minutos la muestra entre los platos una vez se ha llegado al gap de 0,8mm, para asegurar la temperatura de medida.

5

El barrido de esfuerzos a una frecuencia fija permite identificar la zona de viscoelasticidad lineal.

10

Las medidas oscilatorias en la zona de viscoelasticidad lineal son de gran importancia porque la respuesta del material va a ser solo dependiente de la estructura del mismo e independiente de parámetros reológicos como el esfuerzo o la deformación.

15

Durante el ensayo se va representando el valor de  $G'$  y  $G''$  (eje de ordenadas) en función del esfuerzo (eje de abscisas). Los valores de crossover, LVR y límite de fluidez corresponden al esfuerzo, es decir, eje de abscisas

20

El módulo elástico o de almacenamiento ( $G'$ ) está asociado con la energía almacenada en el material mientras que el módulo viscoso o de pérdida ( $G''$ ) está asociado con la energía disipada por el material.

25

El *crossover* es el punto en el que la  $G'$  y  $G''$  se igualan. Coincide con el valor del esfuerzo de cizalla oscilatorio donde se cruzan las curvas de  $G'$  y  $G''$ , y por tanto es el valor de esfuerzo a partir del cual la masa deja de comportarse como un material elástico y empieza a comportarse como un fluido viscoso.

30

Los valores de *crossover* de las masas homogeneizadas son aproximadamente un 40% más altos que de la diluida, lo que implica que la masa mantiene su comportamiento elástico a mayores esfuerzos, y, por tanto, es capaz de soportar más esfuerzo sin perder la estructura.

El barrido de esfuerzos permite determinar el punto de fluencia del material. El valor del módulo elástico permanece constante mientras el material no fluye (comportamiento sólido), pero su valor desciende cuando el material empieza a fluir. El valor del módulo elástico al cual el material empieza a fluir es el Límite de Fluidez

5 e indica el punto a partir del cual la masa empieza a sufrir una deformación permanente. Hasta ese punto la deformación que sufría la masa era recuperable, y por eso el valor de  $G'$  y  $G''$  era constante, pero a partir del límite de fluidez ahí la masa empieza a perder su componente elástica y aumenta la componente viscosa, hasta que en el crossover se igualan y empieza a comportarse como un fluido viscoso. Las Figuras 5 y 6 muestran los gráficos de barridos de esfuerzos de las muestras 531-010, 531-020 y 431-010, 431-020.

10 Las muestras 531-010 y 431-010 son equivalentes a las del ejemplo 1 pero a concentraciones de colágeno del  $4,8 \pm 0.1\%$ . En el caso de las muestras H (431-020 y 531-020) son las mismas dispersiones, pero tras haber sido sometidas a un proceso de homogeneización de alta presión en un homogeneizador industrial que básicamente consiste en hacer pasar la masa por una rendija con ayuda de un pistón y a una presión entre 50 y 300 atmósferas.

15 Las masas diluidas y homogeneizadas 531-020 y 431-020 tienen un Límite de Fluidez más elevado que las diluidas sin homogeneizar 531-010 y 431-010, y por tanto pueden ser sometidas a un esfuerzo mayor manteniendo intacta su componente elástica y, en definitiva, sus propiedades estructurales.

20 Tabla 1 Datos de reología de las tintas 531-010, 431-010, 531-020 y 431-020 de la invención tras realizar un barrido de esfuerzos a una frecuencia de 1 Hz

| Muestra | $G'$ (Pa)* | $G''$ (Pa)* | Crossover (Pa) | Límite de fluidez (Pa) | Viscosidad (mPa·s) |
|---------|------------|-------------|----------------|------------------------|--------------------|
| 531-010 | 9558       | 1049        | 1654           | 1025                   | 23,3               |
| 431-010 | 10292      | 1149        | 1706           | 1129                   | 28,5               |
| 531-020 | 8218       | 742         | 2682           | 1453                   | 6,5                |
| 431-020 | 9661       | 860         | 2941           | 1691                   | 5,3                |

\*Corresponde al valor de  $G'$  y  $G''$  durante los primeros 100 segundos de análisis, asegurando que se encuentra en la fase lineal de la curva

25 Una manera rápida de cuantificar el grado de degradación e hidrólisis del colágeno nativo consiste en determinar la fracción soluble a 10% de sulfato amónico tras centrifugar a 18.000 rpm. Posteriormente se cuantifica el contenido de proteína de

colágeno en dicha fracción con el método Biuret y el resultado se expresa en porcentaje respecto al porcentaje de colágeno, cuantificado previamente mediante el método Biuret. Dicha fracción aparece especialmente en colágenos deteriorados.

- 5 Posteriormente se cuantifica el contenido de proteína de colágeno en dicha fracción con el método Biuret y el resultado se expresa en porcentaje (Tabla 2).

Tabla 2. % de sólidos, y fracción soluble.

| Muestra                    | % Sólidos | %fracción soluble |
|----------------------------|-----------|-------------------|
| (531-010)Sin homogeneizar  | 4,8       | ND                |
| (531-020)Tras homogeneizar | 4,8       | ND                |

- ND: No detectada

10

Se midió la viscosidad de la dispersión de la invención.

La viscosidad de las tintas de la invención se determinó mediante el viscosímetro Brookfield modelo DV2T HBT (Brookfield Ametek). La viscosidad se calcula a partir del torque medido en función del husillo seleccionado y la velocidad de rotación.

15

Los husillos utilizados para este método son los de T invertida. (Helipath with T-Bar Spindle). A continuación, se indican los rangos de viscosidad que mide cada husillo para dicho modelo de viscosímetro.

| T-Bar Spindle | Spindle code | SMC  | Viscosity (cP)        |
|---------------|--------------|------|-----------------------|
| T-A           | 91           | 20   | 16.000 – 16.000.000   |
| T-B           | 92           | 40   | 32.000 – 32.000.000   |
| T-C           | 93           | 100  | 80.000 – 80.000.000   |
| T-D           | 94           | 200  | 160.000 – 160.000.000 |
| T-E           | 95           | 500  | 400.000 – 400.000.000 |
| T-F           | 96           | 1000 | 800.000 – 800.000.000 |

20

\* El SCM (Spindle Multiplier Constant) es una constante característica de cada spindle usada para convertir la medida del torque en viscosidad.

Para rangos de viscosidad inferiores, masas de concentración igual o inferior al 2% de colágeno, se usan otros husillos:

| Spindle | Rango viscosidad (cP) |
|---------|-----------------------|
| HB-1    | 2.096 - 20.960        |
| HB-2    | 8.880 - 88.800        |
| HB-3    | 42.800 - 428.000      |
| HB-4    | 434.400 - 4.344.000   |
| HB-5    | 170.400 - 1.704.000   |

- 5 El equipo se configura de manera que haya que indicar el husillo que se utiliza y la velocidad de rotación y él mismo hace la conversión a la viscosidad en cP.

10 Para ello se colocó la masa en un vaso de precipitados de 250 ml. La temperatura de la masa estuvo en un rango comprendido entre 18°C y 22°C. Se empleó el husillo correspondiente en función de la viscosidad esperada de la masa. Así, para las masas homogeneizadas (531-020) se usó el 94, mientras que las no homogeneizadas (531-010) el 95. La velocidad de rotación fue de 1.0 RPM y se tomaron 250 medidas durante 4 minutos .

15 La medida de la viscosidad se redujo notablemente tras la homogeneización, resultando 23.3 y 6.5 McP para la 531-010 y 531-020 respectivamente (Tabla 1). Esta reducción de la viscosidad facilita notablemente la imprimibilidad de la tinta y reduce la presión necesaria para imprimir la tinta con la impresora.

#### 20 Ejemplo 4. Efecto del pH en la tinta

25 En este caso se ha comparado el comportamiento de la tinta de la invención y de la tinta de la invención neutralizada. Es importante mantener la estructura y la firmeza del material tras neutralizar hasta un pH fisiológico y asegurar que la estructura y forma del constructo 3D que se imprima se va a mantener lo suficientemente firme y permaneciendo estable en las condiciones fisiológicas requeridas para su uso en aplicaciones biomédicas en las que se vayan a utilizar como soporte para crecimiento celular. Como se deriva de la siguiente tabla (Tabla 3), a pesar de la reducción del

módulo elástico, el valor de  $G'$  del material neutralizado (531-010 Neutra y 531-020 Neutra) sigue siendo elevado. Por tanto, dicho material, se mantiene lo suficientemente firme en el tiempo tras neutralizar hasta pH fisiológico con distintas bases y ponerlo en un medio similar a los medios de cultivo para células como puedan ser: PBS, Solución de Hank enriquecida con Calcio (HBSS-Ca) o equivalente.

Se realizó un análisis reológico mediante barrido de frecuencias que consistió en un ensayo oscilatorio a un esfuerzo fijo de 100Pa haciendo un barrido de frecuencias en un rango de 0,01 Hz a 100 Hz y con un gap entre platos de 0,8 mm, siendo la temperatura de medida de 15°C. En la siguiente tabla se representan los valores obtenidos para una frecuencia de 0.1 Hz, donde se puede observar que la estabilidad del material de la invención del Ejemplo 3 a una concentración de colágeno del 4.8%, tras neutralizarlo hasta pH fisiológico con NaOH (0.05M) y equilibrarlo en PBS, mantiene un módulo elástico ( $G'$ ) muy elevado:

Tabla 3 Parámetros reológicos de la tinta de la invención pre y post neutralización hasta pH neutro. Valores a una frecuencia de 0.1Hz.

| Muestra        | $G'$ (Pa) | $G''$ (Pa) |
|----------------|-----------|------------|
| 531-010        | 7800      | 800        |
| 531-010 Neutra | 3400      | 400        |
| 531-020        | 6600      | 610        |
| 531-020 Neutra | 3400      | 370        |

De esta misma manera, se determinó la estabilidad en el tiempo del material neutralizado. Para ello, otro lote (lote 6) preparado como el gel de la invención del Ejemplo 3 se neutralizó con  $\text{NH}_4\text{OH}$  (0.25%) o con NaOH (0.05M) y se ajustó a pH fisiológico con HBSS-Ca. Se tomó una cantidad de muestra de aproximadamente de 0.3 g aproximadamente y se añadió agente neutralizante hasta cubrirlo.

En la siguiente tabla se puede observar que el material, una vez neutralizado con NaOH y tras ser lavado y equilibrado con PBS a pH fisiológico, mantiene, a pesar de una caída inicial, un módulo elástico elevado y estable en el tiempo, lo que confirma el mantenimiento de su estructura en las condiciones fisiológicas equivalentes a las

usadas para cultivo celular (37°C y pH 7,4). Similar observación se obtiene con otras bases como hidróxido amónico y otros medios de equilibrado como HBSS-Ca, lo que confirma el mantenimiento de la forma del constructo estable en los medios de cultivo habituales:

5

Tabla 4 Evolución del módulo de almacenamiento o modulo elástico (G') de la muestra 231-020 neutralizada en el tiempo. Valores a una frecuencia de 0.1Hz.

| G' (Pa) | Day | Base |
|---------|-----|------|
| 4675    | 0   | NaOH |
| 3242    | 7   | NaOH |
| 3038    | 14  | NaOH |

Ejemplo 5. Impresión con la tinta del Ejemplo 3

10 Se realizó una impresión a una velocidad de extrusión de 2 mm/segundo ajustando la presión del equipo en consecuencia (550kPa) y utilizando una cabeza de extrusión de aguja con nozzle 22G. A pesar de ser una tinta con fibras de colágeno no soluble, se apreció la continuidad en el constructo, como se ve en la Figura 7.

15 Ejemplo 6. Imprimibilidad de la tinta de la invención.

En la Figuras 8A-8F se muestran ejemplos de estructuras obtenidas con la tinta del ejemplo 3 a una velocidad de extrusión de 5 mm/segundo ajustando la presión la impresora 3D en consecuencia. Se aprecia la continuidad en los constructos.

20

Las Figuras 8E-F corresponden a constructos 3 D de varias capas.

25 Las figuras 8B, 8D, 8F, corresponden a las mismas estructuras de la izquierda una vez neutralizadas con NaOH 50 mM y ajustado su pH a 7,4, pH fisiológico, con PBS, pH adecuado para una óptima proliferación celular. En todos los casos se mantiene la integridad de la estructura y se permite su manipulación para aplicaciones como las indicadas previamente.

30 Cuando dicha tinta de la invención fue preparada a concentraciones menores del 1%, se observó una gran disminución de la firmeza del constructo, con valores de

viscosidad de 6.000 cP, para una tinta al 1% de colágeno. Por lo tanto, estas condiciones no son óptimas en el caso de que el constructo o matriz se vaya a neutralizar, pero la tinta puede ser útil cuando la estructura impresa no necesita la neutralización.

5

De manera similar ocurría si se reduce excesivamente el pH de la tinta, en las que la elasticidad de la tinta 531-020 disminuía bajando el valor de  $G'$  a 3900 Pa y la viscosidad a 3,14 McP cuando el pH de la tinta era 0,6. Tras la impresión, el constructo perdía la firmeza durante el proceso de neutralización.

10

La utilización de ácido clorhídrico, láctico o acético durante la acidificación de la etapa d) del proceso de obtención daba lugar a tintas perfectamente imprimibles y que mantenían la integridad de los constructos tras la neutralización en los valores de pH y concentración anteriormente citados.

15

#### Ejemplo 7. Análisis morfológico

Se realizó un análisis morfológico mediante análisis dinámico de imagen de las tintas 531-010 y 531-020 del Ejemplo 3. Para ello, la tinta se diluyó aproximadamente al 1% en agua desionizada, y se ajustó a un pH aproximado de 1,5 con HCl 1 M. La muestra diluida se agitó en vórtex durante 10 minutos a 2500 rpm y se diluyó 1/20 con agua desionizada.

20

Las mediciones se realizaron en un analizador de partículas Sympatec QICPIC / Lixell con cubeta (0.5 mm de ancho) de flujo continuo en un rango de medición de tamaño de partícula de 4 - 2888  $\mu\text{m}$ . Debido a la gran heterogeneidad de distribución de partículas, típica de las suspensiones de colágeno, se realizaron al menos 3 mediciones individuales de dos submuestras. En total, se detectaron entre 1 y 3 millones de partículas por muestra.

25

Se realizó una evaluación basada en la distribución de longitud y diámetro de fibra. Se calculó la proporción de fibras de cierta longitud o anchura en la masa total de fibras de colágeno de la muestra. En las Tablas 5 y 6 se indica la longitud y el diámetro (en  $\mu\text{m}$ ) para los porcentajes de 10, 16, 50, 84 y 90% de la distribución acumulativa de las fibras de colágeno en la masa total, calculados a partir de los

30

valores medios.

Tabla 5. Longitudes de fibras ( $\mu\text{m}$ ) correspondientes a los porcentajes acumulados de 10, 16, 50, 84 y 90% de masa total de fibras de colágeno en las tintas de la invención 531-010 y 531-020.

|         | 10% | 16% | 50% | 84%  | 90%  |
|---------|-----|-----|-----|------|------|
| 531-010 | 244 | 336 | 834 | 1775 | 2291 |
| 531-020 | 99  | 135 | 383 | 989  | 1235 |

Tabla 6. Diámetros de fibras ( $\mu\text{m}$ ) correspondientes a los porcentajes acumulados de 10, 16, 50, 84 y 90% de masa total de fibras de colágeno en las tintas de la invención 531-010 y 531-020.

|         | 10%  | 16%  | 50%  | 84%  | 90%  |
|---------|------|------|------|------|------|
| 531-010 | 9.3  | 11.6 | 19.0 | 27.0 | 30.4 |
| 531-020 | 10.2 | 12.3 | 19.2 | 27.6 | 30.8 |

Como se aprecia en la Tabla 5, la muestra 9 D muestra una distribución más amplia de la longitud de la fibra. El valor de la mediana es 838  $\mu\text{m}$ . Esto significa que el 50% de la masa de fibras de colágeno total de la muestra es proporcionada por fibras de longitudes mayores de 838  $\mu\text{m}$ . El 84% de la masa de colágeno es proporcionada por fibras con una longitud de fibra de más de 336  $\mu\text{m}$ . Sin embargo, en la 531-020, la proporción de fibras menores es mucho mayor. Su valor de la mediana de 383  $\mu\text{m}$  es significativamente menor que para la muestra 531-010. Esto significa que la mitad de la masa de colágeno de la muestra 531-020 consiste en fibras con una longitud menor de 383  $\mu\text{m}$ , frente a 838  $\mu\text{m}$  en el caso de la 531-010.

Por tanto, con la homogeneización se acorta el tamaño de las fibras y ello facilita el paso de la tinta por la cabeza de extrusión y, en definitiva, su imprimibilidad, reduciendo la presión necesaria para poder imprimirla con las impresoras comerciales.

La distribución acumulativa de los diámetros de las fibras de las muestras 531-010 y 531-020 (Tabla 6) son casi idénticas con un valor de la mediana de 19  $\mu\text{m}$ , con un

80% de fibras en un rango de diámetro entre 10  $\mu\text{m}$  y 31  $\mu\text{m}$ ,

Las Figura 9A y 9B muestran imágenes por microscopía óptica de partículas individuales de la tinta de la invención 531-010 diluida al 0.1% y teñidas con Sirius Red. Dichas figuras permiten tener una imagen visual de las fibras presentes en la tinta de la invención, donde se observa claramente la amplia distribución de longitudes y diámetros de fibras.

#### Ejemplo 8

Previamente a su impresión, se neutralizó la tinta ácida del ejemplo 1 pero con una concentración del 5%, mezclándola con tris(hidroximetil)aminometano (Tris) 1M ajustado a pH 7,4 en una proporción 3:2 (V:V) para obtener una concentración del 3%. Se podría variar el ratio para conseguir tintas más diluidas. Así mismo, se puede sustituir la mitad del tampón por medio de cultivo como por ejemplo DMEM (Dulbecco's Modification of Eagle's Medium). Para la mezcla se llenó una jeringuilla con 3 ml de colágeno y otra con 2 ml de Tris. Con ayuda de un conector se conectaron las dos jeringuillas y se pasó el contenido de una a otra repitiendo este último paso 40 veces, permitiendo así la mezcla homogénea del contenido. Posteriormente se imprimió ajustando la presión a 70kPa a una velocidad de extrusión de 5mm/s utilizando una cabeza de extrusión de aguja con nozzle 20G. La impresión realizada se muestra en la Figura 10.

#### Ejemplo 9. Encapsulación celular en tinta neutra de colágeno

Las cantidades sugeridas en este ejemplo sobre la densidad celular se basa en estudios con células fibroblásticas murinas. El método empleado en este ejemplo para la mezcla de los diferentes componentes se realiza de manera similar a la del ejemplo 8 de tinta neutralizada.

Se obtuvo la masa de colágeno a un pH neutro tal y cómo se menciona en el ejemplo 1. En este caso, a partir de las cantidades calculadas para la mezcla de masa de colágeno a pH ácido con el tampón correspondiente, se calculó la cantidad necesaria para la mezcla posterior con las células. Para ello se mezclaron tres partes de colágeno, una de tampón y una de medio de cultivo DMEM (Dulbecco's Modification of Eagle's Medium) con las células. En esta ocasión la masa de colágeno ácida se

mezcló con el tampón correspondiente 40 veces (tal y como se menciona en el ejemplo anterior de tinta neutralizada) y a continuación, se mezcló de la misma manera con el medio de cultivo conteniendo las células, pero en esta ocasión un total de 20 veces.

5

Para la obtención del medio de cultivo con las células se llevó a cabo un protocolo habitual de recolección celular para obtenerlas en suspensión con una densidad aproximada de 200.000 células/mL.

10

Una vez mezclados todos los componentes se procedió a la bioimpresión de la misma en placas preparadas para el cultivo celular. Una vez bioimpresos los constructos se adicionó DMEM enriquecido hasta cubrir el scaffold o constructo en su totalidad. Se realizaron pruebas de viabilidad celular (Live/Dead Assay) a los 5 días tras la bioimpresión de las células. Para la complementación del estudio, los scaffolds (soporte) se digirieron mediante un tratamiento combinado de tripsina-EDTA y colagenasa para la obtención de las células, tanto las de superficie como las embebidas en la tinta (primera incubación de 20 minutos con Tripsina-EDTA 0,05%; seguida de una segunda con colagenasa 500U/ml hasta la total disolución del scaffold). Los resultados mostraron viabilidad celular superiores al 90%.

15

20

## REIVINDICACIONES

1. Tinta de colágeno para impresión 3D que comprende una dispersión de fibras de colágeno nativo en medio ácido en una concentración comprendida entre el 0,1% y el 10% con un pH entre 0,1 y 5, que presenta una viscosidad comprendida entre 10 cP y 50 McP (método Brookfield a una temperatura entre 18°C y 22°C) y donde la dispersión de fibras comprende más del 90% de fibras cuyo longitud, medida a un pH entre 1 y 2, se encuentra en un rango de 1µm a 2500µm y su diámetro en un rango de 0.1µm a 150µm.
2. Tinta de colágeno para la impresión 3D según la reivindicación 1 caracterizado porque al menos el 90% de la masa de fibras de colágeno de la dispersión comprende fibras cuya longitud se encuentra en un rango de 50µm a 2500µm.
3. Tinta de colágeno para la impresión 3D según la reivindicación 1 y 2 caracterizado por que el 75% de la masa de fibras de colágeno de la dispersión comprende fibras cuya longitud se encuentra en un rango de 50µm a 1000µm.
4. Tinta de colágeno para la impresión 3D según la reivindicación 1 y 2 caracterizado por que el 50% de la masa de fibras de colágeno de la dispersión comprende fibras cuya longitud se encuentra en un rango entre 100 µm y 500 µm.
5. Tinta de colágeno para la impresión 3D según alguna de las reivindicaciones 1 a 4 caracterizado porque el 80% de la masa fibras de colágeno comprende fibras cuyo diámetro se encuentra comprendido preferentemente entre 5µm y 35µm.
6. Tinta de colágeno para la impresión 3D según alguna de las reivindicaciones 1 a 5 caracterizado porque la concentración está comprendida entre el 1% y el 5%.
7. Tinta de colágeno para la impresión 3D según alguna de las reivindicaciones 1 a 6 caracterizado porque el pH se encuentra comprendido entre pH 1 y 3.
8. Tinta de colágeno para la impresión 3D según alguna de las reivindicaciones 1 a 7 caracterizado porque la viscosidad está comprendida entre 2 McP y 15 McP.

9. Hidrogel que comprende la tinta según alguna de las reivindicaciones 1 a 8.
- 5 10. Procedimiento de obtención de la tinta según las reivindicaciones 1 a 8 a partir de un tejido con contenido en colágeno que comprende las etapas de:
- a) lavar, y trocear un tejido que contiene el colágeno;
  - b) macerar químicamente de manera controlada el tejido troceado;
  - c) lavar con agua el producto obtenido de la etapa b);
  - 10 d) ajustar el pH del producto lado obtenido en c) a valores entre 0,5 y 5 para hinchar el producto lado de la etapa c);
  - e) picar mecánicamente el producto de la etapa d);
  - f) dispersar en agua hasta una concentración preferiblemente entre el 0,1% y el 10%.
- 15 11. Procedimiento según la reivindicación 10 caracterizado porque el tejido que contiene colágeno es tejido conectivo.
- 20 12. Procedimiento según la reivindicación 11 caracterizada porque el tejido conectivo es tejido de dermis de la capa denominada corium.
- 25 13. Procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones 10 a 11 caracterizada porque el tejido conectivo es de origen bovino, con una edad entre 1 y 3 años.
- 30 14. Procedimiento según alguna de las reivindicaciones 10 a 13 caracterizado porque la etapa c) se realiza en presencia de un agente alcalino.
15. Procedimiento según alguna de las reivindicaciones 10 a 14 caracterizado porque en la etapa d) se acidifica entre 1 y 3.
16. Procedimiento según alguna de las reivindicaciones 10 a 15 caracterizado porque hay una etapa de homogenización del precipitado obtenido en la etapa d) previo a la etapa e).

- 5 17. Procedimiento según alguna de las reivindicaciones 10 a 16 caracterizado porque la dispersión acuosa de colágeno fibroso se realiza a una concentración que está comprendida entre el 1% y el 5%.
18. Uso de la tinta según alguna de las reivindicaciones 1 a 8 en impresiones de estructuras 3D.
- 10 19. Estructuras que comprenden la tinta según alguna de las reivindicaciones 1 a 8.
- 15 20. Procedimiento de impresión con la tinta descrita en alguna de las reivindicaciones 1 a 8 caracterizado porque comprende la etapa de mezclar la tinta descrita en alguna de las reivindicaciones 1 a 8 con células antes de realizar impresión.
- 20 21. Procedimiento según la reivindicación 20 caracterizado porque la células se seleccionan entre: astrocitos, cardiomiocitos embrionarios, cardiomiocitos fetales, cardiomiocitos neonatales, cardiomiocitos, miocitos ventriculares embrionarios, células endoteliales de la córnea, células epiteliales de la córnea, células epiteliales del pigmento del iris, células epiteliales pigmentarias de la retina, células neuronales de dopamina fetal, células neuronales neocorticales fetales, células neuronales entéricas, hepatocitos, células madre mesenquimales de tejido adiposo, células madre mesenquimales de la médula ósea, osteoblastos, condrocitos, células pancreáticas, células uroteliales.
- 25 22. Procedimiento de impresión de la tinta descrita en alguna de las reivindicaciones 1 a 8 caracterizado porque comprende las etapas de:  
neutralizar la tinta a un pH fisiológico, preferiblemente entre 7 y 8;  
30 imprimir la estructura.
23. Procedimiento según la reivindicación 22 caracterizado porque la tinta se mezclas con células.

24. Procedimiento según la reivindicación 22 caracterizado porque la neutralización se realiza con sales o tampones seleccionado entre: tampón fosfato salino (PBS 1X y 10X), Tricina, MOPS, HEPES, Tris, carbonato sódico.

5

10

15

20

25

30