

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 812 249**

51 Int. Cl.:

**C07K 14/78** (2006.01)

**D06N 3/00** (2006.01)

**D01F 4/00** (2006.01)

**D01F 11/02** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **15.02.2017** **E 17156362 (0)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **29.04.2020** **EP 3205667**

54 Título: **Material biofabricado que contiene fibrillas de colágeno**

30 Prioridad:

**15.02.2016 US 201662295435 P**

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

**16.03.2021**

73 Titular/es:

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

72 Inventor/es:

**PURCELL, BRENDAN PATRICK;  
WILLIAMSON, DAVID THOMAS;  
DAI, LIXIN;  
CASSINGHAM, DARRYL MILES y  
SPINELLA, STEPHEN M.**

74 Agente/Representante:

**VALLEJO LÓPEZ, Juan Pedro**

**ES 2 812 249 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

Material biofabricado que contiene fibrillas de colágeno

5 **Referencia cruzada a solicitudes relacionadas**

La presente solicitud reclama prioridad sobre la solicitud provisional de EE.UU. N.º 62/295.435 presentada el 15 de febrero de 2016. La presente solicitud se refiere al documento US 2013255003, titulado "CUERO MODIFICADO POR INGENIERÍA Y PROCEDIMIENTOS DE FABRICACIÓN DEL MISMO" y presentado el 28/03/2013; El documento US 2016097109, titulado "CUERO MODIFICADO POR INGENIERÍA Y PROCEDIMIENTOS DE FABRICACIÓN DEL MISMO" y presentado el 11/12/2015; y el documento WO 2016/073453, titulado "BIOMATERIALES MODIFICADOS POR INGENIERÍA REFORZADOS Y PROCEDIMIENTOS DE FABRICACIÓN DE LOS MISMOS" y presentado el 11/3/2015.

15 **Antecedentes de la invención****Campo de la invención**

La presente invención se refiere a materiales de cuero biofabricados compuestos por fibrillas de colágeno triméricas, desagregadas y orientadas al azar, que presentan una resistencia superior, propiedades no anisotrópicas y uniformidad en comparación con los productos de cuero convencionales, pero que tienen el aspecto, tacto y otras propiedades estéticas del cuero natural. A diferencia de los productos de cuero sintético compuestos de resinas plásticas, el cuero biofabricado de la invención está basado en colágeno, Un componente natural del cuero.

25 **Descripción de la técnica relacionada**

Cuero. El cuero se usa en una gran variedad de aplicaciones, incluyendo tapicería de muebles, prendas de ropa, zapatos, equipaje, bolsos de mano y accesorios, y aplicaciones de automoción. El valor estimado del comercio mundial de cuero es de aproximadamente 100 mil millones de dólares americanos al año (Future Trends in the World Leather Products Industry and Trade, United Nations Industrial Development Organization, Viena, 2010) y existe una demanda continua y creciente de productos de cuero. Se requieren nuevas formas de satisfacer esta demanda en vista de los costes económicos, ambientales y sociales de la producción de cuero. Para mantenerse al día con las tendencias tecnológicas y estéticas, los productores y usuarios de productos de cuero buscan nuevos materiales que exhiban una resistencia superior, uniformidad, procesabilidad y propiedades estéticas modernas y atractivas que incorporen componentes naturales.

Los cueros naturales se producen a partir de las pieles de animales que requieren criar ganado. Sin embargo, la cría de ganado requiere enormes cantidades de alimento, pastos, agua y combustibles fósiles. También produce contaminación del aire y de las vías fluviales, incluida la producción de gases de efecto invernadero como el metano. Algunos estados en Estados Unidos, como California, pueden imponer impuestos sobre las cantidades de contaminantes como el metano producido por el ganado. A medida que aumentan los costes de la cría de ganado, el coste del cuero aumentará.

La industria mundial del cuero mata a más de mil millones de animales al año. La mayor parte del cuero se produce en países que se dedican a la agricultura industrial, carecen de leyes de bienestar animal, o en las cuales dichas leyes no se aplican en gran medida o por completo. El sacrificio en condiciones inhumanas es inaceptable para muchas personas con conciencia social. Por consiguiente, hay una demanda de los consumidores con objeciones éticas, morales o religiosas al uso de productos de cuero natural para productos producidos de forma humana sin el maltrato o sacrificio de animales o producidos de manera que minimice el número de animales sacrificados.

El manejo y procesamiento de pieles de animales en cuero también presenta riesgos para la salud porque el manejo de las pieles de animales puede exponer a los trabajadores al ántrax y a otros patógenos y alérgenos como los que se encuentran en el polvo de cuero. La cría industrial de animales contribuye a la propagación de la gripe (por ejemplo, "gripe aviar") y otras enfermedades infecciosas que eventualmente pueden mutar e infectar al ser humano. Los productos derivados de animales también son susceptibles a la contaminación con virus y priones ("enfermedad de las vacas locas"). Para tranquilidad del productor y el consumidor, existe una demanda de productos de cuero que no presenten estos riesgos.

El cuero natural es generalmente un material duradero y flexible creado al procesar el cuero crudo y la piel de un animal, tales como las pieles de ganado vacuno. Este procesamiento generalmente implica tres partes principales: etapas preparatorias, curtido y recurtido. También puede haber cuero recubierto en superficie o gofrado.

Se conocen numerosas formas de preparar una piel o pellejo y convertirla en cuero. Estas incluyen salar o refrigerar una piel o pellejo para preservarla; empapar o rehidratar el pellejo en una solución acuosa que contiene tensioactivos u otros productos químicos para eliminar la sal, la suciedad, residuos, sangre y exceso de grasa; descarnar o eliminar material subcutáneo del pellejo; depilar o desenredar el pellejo quita la mayor parte del pelo; alcalinizar el pellejo para

aflorar las fibras y abrir los paquetes de colágeno que le permiten absorber sustancias químicas; dividir el pellejo en dos o más capas; desalcalinizar el pellejo para eliminar el álcali y reducir su pH; golpear el pellejo para completar el proceso de desalcalinización y suavizar el grano; desengrasar para eliminar el exceso de grasas; encrespamiento; blanqueo; piquelado alterando el pH; o despiqueado.

5 Una vez que se completan las etapas preparatorias, se curte el cuero. El cuero se curte para aumentar su durabilidad en comparación con la piel no tratada. El curtido convierte las proteínas en el pellejo o la piel en un material estable que no se pudrirá al tiempo que permite que el material de cuero permanezca flexible. Durante el curtido, la estructura de la piel puede estabilizarse en una forma "abierta" haciendo reaccionar parte del colágeno con iones complejos de cromo u otros agentes curtidores. Dependiendo de los compuestos utilizados, el color y la textura del cuero pueden cambiar.

15 El curtido se entiende generalmente como el proceso de tratar las pieles de los animales para producir cuero. El curtido se puede realizar de muchas maneras bien conocidas, incluso al poner en contacto una piel o pellejo con un agente de curtido vegetal, compuesto de cromo, aldehído, syntan, resina o polímero sintético, semisintético o natural, y/o aceite natural curtido o aceite modificado. Los taninos vegetales incluyen taninos a base de pirogalol o pirocatequina, tales como taninos de valonea, mimosa, ten, alquitranes, roble, pinar, zumaque, quebracho y castaño; los agentes de curtido de cromo incluyen sales de cromo como sulfato de cromo; los agentes curtientes de aldehído incluyen glutaraldehído y compuestos de oxazolidina, los sintanes incluyen polímeros aromáticos, poliacrílatos, polimetacrílatos, copolímeros de anhídrido maleico y estireno, productos de condensación de formaldehído con melamina o dicianidamida, ligninas y harinas naturales.

20 El cromo es el material curtiente más utilizado. Se puede ajustar el pH de la piel/pellejo (por ejemplo, disminuido, por ejemplo un pH de 2,8-3,2) para permitir la penetración del agente curtiente; después de la penetración, el pH puede elevarse para fijar el agente curtiente ("basificación" a un nivel ligeramente más alto, por ejemplo, pH 3,8-4,2 para cromo).

30 Después del curtido, un cuero se puede volver a curtir. El recurtido se refiere al tratamiento posterior al curtido que puede incluir coloración (tinte), adelgazamiento, secado o hidratación, y similares. Los ejemplos de técnicas de recurtido incluyen: curtido, humectación (rehidratación), escurrido (secado), neutralización (ajuste del pH a un estado menos ácido o alcalino), tintado, licor de grasa, fijación de sustancias químicas no unidas, endurecimiento, acondicionado, ablandamiento, abrillantado, etc.

35 Un producto de cuero curtido puede estar acabado mecánica o químicamente. El acabado mecánico puede pulir el cuero para producir una superficie brillante, planchar y aplanar un cuero para que tenga una superficie plana y lisa, gofrar un cuero para proporcionar un estampado o patrón tridimensional, o girar un cuero para proporcionar un grano más evidente y una superficie lisa. El acabado químico puede implicar la aplicación de una película, un recubrimiento natural o sintético u otro tratamiento de cuero. Estos pueden aplicarse, por ejemplo, mediante pulverización, recubrimiento de cortina o recubrimiento de rodillos.

40 En el pellejo de animal, se observan variaciones en la organización del colágeno fibroso en animales de diferentes edades o especies. Estas diferencias afectan a las propiedades físicas de los pellejos y las diferencias en el cuerpo producido a partir de los pellejos. Las variaciones en la organización del colágeno también se producen a través del grosor del pellejo. El lado superior del grano del pellejo está compuesto por una red fina de fibrillas de colágeno, mientras que las secciones más profundas (corium) están compuestas por haces de fibras más grandes (FIG. 2). La organización de fibrillas más pequeñas de la capa de grano da lugar a una estética de cuero suave y lisa, mientras que la organización más grande del haz de fibras de las regiones más profundas da lugar a una estética de cuero rugosa y dura.

50 La organización fibrosa porosa del colágeno en un pellejo permite que las moléculas aplicadas penetren, lo estabilicen y lubriquen durante el curtido del cuero. La combinación de la organización innata del colágeno en el pellejo y las modificaciones logradas mediante el curtido dan lugar a las propiedades deseables de resistencia, caída y estéticas del cuero.

55 La superficie de grano superior del cuero a menudo se considera la más deseable debido a su blandura y textura blanda. Este grano de cuero contiene una red altamente porosa de fibrillas de colágeno organizadas. Las fibrillas de colágeno endógeno están organizadas de modo que tengan regiones lacunares y regiones superpuestas; véase la organización jerárquica del colágeno representada por la FIG. 1. Las resistencias, la porosidad a microescala y la densidad de las fibrillas en un cuero de grano superior permiten que los agentes curtientes o engrasantes lo penetren, estabilizando y lubricando de este modo las fibrillas de colágeno, produciendo un cuero blando, liso y fuerte que la gente desea.

65 Los pellejos de cuero se pueden dividir para obtener cuero que es principalmente de grano superior. El pellejo dividido puede desgastarse aún más para reducir el corium de grano más grueso en el lado dividido, pero siempre hay algo de corium residual y aspecto rugoso asociado. Para producir cuero con grano liso en ambos lados, es necesario combinar dos piezas de grano, lado del corium hacia el lado del corium y coserlos juntos o laminarlos con adhesivos con los

lados lisos del grano superior hacia afuera. Existe una demanda de un producto de cuero que tenga una superficie de tipo grano superior lisa en ambos lados, porque esto evitaría la necesidad de dividir y coser o laminar dos piezas de cuero divididas.

- 5 El control de las propiedades finales del cuero está limitado por la variación natural en la estructura del colágeno entre diferentes pellejos de animales. Por ejemplo, el grosor relativo del grano respecto al corium en el pellejo de cabra es significativamente mayor que el de el pellejo de canguro. Además, el ángulo de tejido de los haces de fibras de colágeno en el corium de canguro es mucho más paralelo a la superficie del pellejo, mientras que los haces de fibras en el corium bovino están orientados en orientaciones paralelas y perpendiculares a la superficie del pellejo. Además, la densidad de los haces de fibras varía dentro de cada pellejo dependiendo de su ubicación anatómica. El pellejo obtenido del trasero, la tripa, el hombro y el cuello pueden tener diferentes composiciones y propiedades. La edad de un animal también afecta a la composición de su pellejo, por ejemplo, pellejo bovino juvenil contiene fibras de menor diámetro que los haces de fibras más grandes que se encuentran en el pellejo bovino adulto.
- 10
- 15 Las propiedades finales del cuero pueden controlarse en cierta medida mediante la incorporación de moléculas estabilizadoras y lubricantes en el cuero o la piel durante el curtido y el recurtido, sin embargo, la selección de estas moléculas está limitada por la necesidad de penetrar en la estructura densa de la piel o el pellejo. Las partículas tan grandes como de varios micrómetros de diámetro se han incorporado al cuero para una mejor lubricación; sin embargo, la aplicación de estas partículas se limita a pellejos con los poros de mayor tamaño. Distribuir uniformemente las partículas por todo el pellejo presenta muchos desafíos.
- 20

**Colágeno.** El colágeno es un componente del cuero. La piel o el pellejo del animal, contiene cantidades significativas de colágeno, una proteína fibrosa. Colágeno es un término genérico para una familia de al menos 28 tipos distintos de colágeno; la piel animal es normalmente colágeno de tipo I, aunque se pueden usar otros tipos de colágeno para formar cuero, incluido el colágeno de tipo III.

25

Los colágenos se caracterizan por un triplete repetitivo de aminoácidos,  $-(\text{Gly-X-Y})_n-$  y aproximadamente un tercio de los restos de aminoácidos en el colágeno son glicina. X es a menudo prolina e Y es a menudo hidroxiprolina, aunque puede haber hasta 400 posibles tripletes de Gly-X-Y. Diferentes animales pueden producir diferentes composiciones de aminoácidos del colágeno, lo que puede dar como resultado diferentes propiedades y diferencias en el cuero resultante.

30

La estructura del colágeno puede consistir en tres cadenas peptídicas entrelazadas de diferentes longitudes. Las triples hélices de colágeno (o monómeros) pueden producirse a partir de cadenas alfa de aproximadamente 1.050 aminoácidos de longitud, para que la triple hélice tome la forma de una barra de aproximadamente 300 nm de longitud, con un diámetro de aproximadamente 1,5 nm.

35

En la producción de matriz extracelular por las células de piel fibroblastos, pueden sintetizarse monómeros de la triple hélice y los monómeros pueden autoensamblarse en forma fibrosa. Estas triples hélices se mantienen unidas por interacciones electrostáticas que incluyen puentes salinos, enlaces de hidrógeno, interacciones de Van der Waals, fuerzas dipolo-dipolo, fuerzas de polarización, interacciones hidrófobas y/o enlaces covalentes. Las triples hélices pueden unirse entre sí en haces denominados fibrillas y las fibrillas pueden ensamblarse además para crear fibras y haces de fibras (FIG. 1).

40

Las fibrillas tienen un aspecto de bandas característico debido a la superposición escalonada de los monómeros de colágeno. La distancia entre bandas es de aproximadamente 67 nm para el colágeno de tipo I. Las fibrillas y las fibras generalmente se ramifican e interaccionan entre sí a través de una capa de piel. Las variaciones de la organización o reticulación de fibrillas y fibras pueden proporcionar resistencia al material.

45

Las fibras pueden tener un intervalo de diámetros dependiendo del tipo de pellejo del animal. Además del colágeno de tipo I, la piel (pellejos) también puede incluir otros tipos de colágeno, incluyendo colágeno de tipo III (reticulina), colágeno de tipo IV y colágeno de tipo VII.

50

Existen varios tipos de colágeno en todo el cuerpo de los mamíferos. Por ejemplo, además de ser el componente principal de la piel y el pellejo del animal, el colágeno de tipo I también existe en el cartílago, los tendones, la ligadura vascular, los órganos, el músculo y la porción orgánica del hueso. Se han realizado esfuerzos exitosos para aislar el colágeno de varias regiones del cuerpo de los mamíferos, además de la piel o el pellejo del animal. Hace décadas, los investigadores descubrieron que a pH neutro, el colágeno solubilizado en ácido autoensamblado en fibrillas compuestas de los mismos patrones de estrías cruzadas observados en el tejido nativo; Schmitt F.O. J. Cell. Comp Physiol. 1942;20:11). Esto condujo al uso de colágeno en la ingeniería de tejidos y diversas aplicaciones biomédicas. En años más recientes, el colágeno se ha cosechado a partir de bacterias y levaduras utilizando técnicas recombinantes.

55

60

Independientemente del tipo de colágeno, todos se forman y estabilizan a través de una combinación de interacciones físicas y químicas, incluidas las interacciones electrostáticas, incluidos puentes salinos, enlaces de hidrógeno, interacciones de Van der Waals, fuerzas dipolo-dipolo, fuerzas de polarización, interacciones hidrofóbicas y enlaces

65

covalentes a menudo catalizados por reacciones enzimáticas. Para las fibrillas de colágeno de tipo I, fibras y haces de fibras, su ensamblaje complejo se logra *in vivo* durante el desarrollo y es fundamental para proporcionar soporte mecánico al tejido al tiempo que permite la movilidad celular y el transporte de nutrientes. Se han identificado varios tipos distintos de colágeno en los vertebrados. Estos incluyen colágenos bovinos, ovinos, porcinos, de pollo y humanos.

De forma general, los tipos de colágeno están numerados con números romanos y las cadenas que se encuentran en cada tipo de colágeno se identifican con números arábigos. Las descripciones detalladas de la estructura y las funciones biológicas de los diferentes tipos de colágenos naturales están disponibles en la técnica; véase, por ejemplo, Ayad et al. (1998) *The Extracellular Matrix Facts Book*, Academic Press, San Diego, California; Burgeson, R E. y Nimmi (1992) "Collagen types: Molecular Structure and Tissue Distribution" in *Clin. Orthop.* 282:250-272; Kielty, C. M. et al. (1993) "The Collagen Family: Structure, Assembly And Organization In The Extracellular Matrix," *Connective Tissue And Its Heritable Disorders, Molecular Genetics, And Medical Aspects*, Royce, P. M. y B. Steinmann eds., Wiley-Liss, NY, pp. 103-147; y Prockop, D.J- y K.I. Kivirikko (1995) "Collagens: Molecular Biology, Diseases, and Potentials for Therapy," *Annu.Rev. Biochem.*, 64:403-434.)

El colágeno de tipo I es el colágeno fibrilar principal de hueso y piel que comprende aproximadamente el 80-90 % del colágeno total de un organismo. El colágeno de tipo I es la principal macromolécula estructural presente en la matriz extracelular de organismos multicelulares y comprende aproximadamente el 20 % de la masa proteica total. El colágeno de tipo I es una molécula heterotrimérica que comprende dos cadenas  $\alpha 1(I)$  y una cadena  $\alpha 2(I)$ , codificadas por los genes COL1A1 y COL1A2, respectivamente. Otros tipos de colágeno son menos abundantes que el colágeno de tipo I y exhiben diferentes patrones de distribución. Por ejemplo, el colágeno de tipo II es el colágeno predominante en el cartílago y el humor vítreo, mientras que el colágeno de tipo III se encuentra en niveles altos en los vasos sanguíneos y, en menor medida, en la piel.

El colágeno de tipo II es un colágeno homotrimérico que comprende tres cadenas  $\alpha(II)$  idénticas codificadas por el gen COL2A1. El colágeno de tipo II purificado puede prepararse a partir de tejidos mediante procedimientos conocidos en la técnica, por ejemplo, por procedimientos descritos en Miller y Rhodes (1982) *Methods In Enzymology* 82: 33-64.

El colágeno de tipo III es un colágeno fibrilar importante que se encuentra en la piel y los tejidos vasculares. El colágeno de tipo III es un colágeno homotrimérico que comprende tres cadenas  $\alpha 1(III)$  idénticas codificadas por el gen COL3A1. Los procedimientos para purificar el colágeno de tipo III de los tejidos se pueden encontrar en, por ejemplo, Byers et al. (1974) *Biochemistry* 13:5243-5248; y Miller y Rhodes, anteriormente citado.

El colágeno de tipo IV se encuentra en las membranas basales en forma de láminas en lugar de fibrillas. Muy frecuentemente, el colágeno de tipo IV contiene dos cadenas  $\alpha 1(IV)$  y una cadena  $\alpha 2(IV)$ . Las cadenas particulares que comprenden colágeno de tipo IV son específicas de tejido. El colágeno de tipo IV se puede purificar usando, por ejemplo, los procedimientos descritos en Furuto y Miller (1987) *Methods in Enzymology*, 144:41-61, Academic Press.

El colágeno de tipo V es un colágeno fibrilar que se encuentra en, ante todo, huesos, tendones, córnea, piel y vasos sanguíneos. El colágeno de tipo V existe tanto en forma tanto homotrimérica como heterotrimérica. Una forma de colágeno de tipo V es un heterotrimérico de dos cadenas  $\alpha 1(V)$  y una cadena  $\alpha 2(V)$ . Otra forma de colágeno de tipo V es un homotrimérico de cadenas  $\alpha 1(V)$ ,  $\alpha 2(V)$  y  $\alpha 3(V)$ . Una forma adicional de colágeno de tipo V es un homotrimérico de  $\alpha 1(V)$ . Se pueden encontrar procedimientos para aislar el colágeno de tipo V de las fuentes naturales, por ejemplo, en Elstow y Weiss (1983) *Collagen Rel. Res.* 3:181-193 y Abedin et al. (1982) *Biosci. Rep.* 2:493-502.

El colágeno de tipo VI tiene una pequeña región helicoidal triple y dos grandes porciones no colagenosas de residuos. El colágeno de tipo VI es un heterotrimérico que comprende cadenas  $\alpha 1(VI)$ ,  $\alpha 2(VI)$  y  $\alpha 3(VI)$ . El colágeno de tipo VI se encuentra en muchos tejidos conjuntivos. Se pueden encontrar descripciones de cómo purificar el colágeno de tipo VI de fuentes naturales, por ejemplo, en Wu et al. (1987) *Biochem. J.* 248:373-381 y Kielty et al. (1991) *J. Cell Sci.* 99:797-807.

El colágeno de tipo VII es un colágeno fibrilar que se encuentra en tejidos epiteliales particulares. El colágeno de tipo VII es una molécula homotrimérica de tres cadenas  $\alpha 1(VII)$ . Se pueden encontrar descripciones de cómo purificar el colágeno de tipo VII del tejido en, por ejemplo, Lunstrum et al. (1986) *J. Biol. Chem.* 261:9042-9048 y Bentz et al. (1983) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 80:3168-3172. El colágeno de tipo VIII se puede encontrar en la membrana de Descemet en la córnea. El colágeno de tipo VIII es un heterotrimérico que comprende dos cadenas  $\alpha 1(VIII)$  y una cadena  $\alpha 2(VIII)$ , aunque se han notificado otras composiciones de cadena. Se pueden encontrar procedimientos para la purificación del colágeno de tipo VIII de la naturaleza, por ejemplo, en Benya y Padilla (1986) *J. Biol. Chem.* 261:4160-4169 y Kapoor et al. (1986) *Biochemistry* 25:3930-3937.

El colágeno de tipo IX es un colágeno asociado a fibrillas que se encuentra en el cartílago y el humor vítreo. El colágeno de tipo IX es una molécula heterotrimérica que comprende cadenas  $\alpha 1(IX)$ ,  $\alpha 2(IX)$  y  $\alpha 3(IX)$ . El colágeno de tipo IX se ha clasificado como un colágeno FACIT (colágenos asociados a fibrillas con hélices triples interrumpidas), que posee varios dominios de triple hélice separados por dominios helicoidales no triples. Se pueden encontrar procedimientos para purificar el colágeno de tipo IX, por ejemplo, en Duance, et al. (1984) *Biochem. J.* 221:885-889; Ayad et al. (1989)

Biochem. J. 262:753-761; y Grant et al. (1988) *The Control of Tissue Damage*, Glauert, A. M., ed., Elsevier Science Publishers, Ámsterdam, pp. 3-28.

5 El colágeno de tipo X es un compuesto homotrimérico de cadenas  $\alpha 1(X)$ . El colágeno de tipo X ha sido aislado de, por ejemplo, cartílago hipertrófico encontrado en las placas de crecimiento; véase, por ejemplo, Apte et al. (1992) *Eur J Biochem* 206 (1):217-24.

10 El colágeno de tipo XI se puede encontrar en los tejidos cartilaginosos asociados con colágenos de tipo II y de tipo IX, y en otros lugares del cuerpo. El colágeno de tipo XI es una molécula heterotrimérica que comprende  $\alpha 1(XI)$ ,  $\alpha 2(XI)$  y  $\alpha 3(XI)$ . Se pueden encontrar procedimientos para purificar el colágeno de tipo XI, por ejemplo, en Grant et al., anteriormente citado.

15 El colágeno de tipo XII es un colágeno FACIT que se encuentra principalmente en asociación con el colágeno de tipo I. El colágeno de tipo XII es una molécula homotrimérica que comprende tres cadenas  $\alpha 1(XII)$ . Se pueden encontrar procedimientos para purificar el colágeno de tipo XII y sus variantes, por ejemplo, en Dublet et al. (1989) *J. Biol. Chem.* 264:13150-13156; Lunstrum et al. (1992) *J. Biol. Chem.* 267:20087-20092; y Watt et al. (1992) *J. Biol. Chem.* 267:20093-20099.

20 El tipo XIII es un colágeno no fibrilar encontrado, por ejemplo, en la piel, intestino, hueso, cartílago y músculo estriado. Se puede encontrar una descripción detallada del colágeno de tipo XIII, por ejemplo, en Juvonen et al. (1992) *J. Biol. Chem.* 267: 24700-24707.

25 El tipo XIV es un colágeno FACIT caracterizado como una molécula homotrimérica que comprende cadenas  $\alpha 1(XIV)$ . Se pueden encontrar procedimientos para aislar el colágeno de tipo XIV, por ejemplo, en Aubert-Foucher et al. (1992) *J. Biol. Chem.* 267:15759-15764 y Watt et al., anteriormente citado.

30 El colágeno de tipo XV tiene una estructura homóloga al colágeno de tipo XVIII. Se puede encontrar información sobre la estructura y el aislamiento del colágeno natural de tipo XV, por ejemplo, en Myers et al. (1992) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89:10144-10148; Huebner et al. (1992) *Genomics* 14:220-224; Kivirikko et al. (1994) *J. Biol. Chem.* 269:4773-4779; y Muragaki, J. (1994) *Biol. Chem.* 264:4042-4046.

35 El colágeno de tipo XVI es un colágeno asociado a fibrillas, encontrado, por ejemplo, en la piel, fibroblastos de pulmón y queratinocitos. Se puede encontrar información sobre la estructura del colágeno de tipo XVI y el gen que codifica el colágeno de tipo XVI, por ejemplo, en Pan et al. (1992) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89:6565-6569; y Yamaguchi et al. (1992) *J. Biochem.* 112:856-863.

40 El colágeno de tipo XVII es un colágeno transmembrana hemidesmosomal, también conocido en el antígeno penfigoide ampolloso. Se puede encontrar información sobre la estructura del colágeno de tipo XVII y el gen que codifica el colágeno de tipo XVII, por ejemplo, en Li et al. (1993) *J. Biol. Chem.* 268 (12): 8825-8834; y McGrath et al. (1995) *Nat. Genet.* 11(1):83-86.

45 El colágeno de tipo XVIII es similar en estructura al colágeno de tipo XV y puede aislarse del hígado. Se pueden encontrar descripciones de las estructuras y el aislamiento del colágeno de tipo XVIII de fuentes naturales, por ejemplo, en Rehn y Pihlajaniemi (1994) *Proc. Natl. Acad. Sci USA* 91:4234-4238; Oh et al. (1994) *Proc. Natl. Acad. Sci USA* 91:4229-4233; Rehn et al. (1994) *J. Biol. Chem.* 269:13924-13935; y Oh et al. (1994) *Genomics* 19:494-499.

50 Se cree que el colágeno de tipo XIX es otro miembro de la familia de colágeno FACIT, y se ha encontrado en ARNm aislado de células de rhabdomiosarcoma. Se pueden encontrar descripciones de las estructuras y el aislamiento del colágeno de tipo XIX, por ejemplo, en Inoguchi et al. (1995) *J. Biochem.* 117:137-146; Yoshioka et al. (1992) *Genomics* 13:884-886; y Myers et al., *J. Biol. Chem.* 269: 18549-18557(1994).

55 El colágeno de tipo XX es un miembro recién encontrado de la familia de colágeno FACIT, y se ha identificado en la córnea de pollo. (Véase, por ejemplo, Gordon et al. (1999) *FASEB Journal* 13:A1119; y Gordon et al. (1998), *IOVS* 39:S1128.)

60 Cualquier tipo de colágeno, colágeno truncado, colágeno de secuencia no modificada o modificada postraduccionalmente o modificada con aminoácidos que puede fibrilarse y reticularse mediante los procedimientos descritos en el presente documento puede usarse para producir un material biofabricado o cuero biofabricado. El cuero biofabricado puede contener un colágeno sustancialmente homogéneo, tal como solo colágeno de tipo I o tipo III o puede contener mezclas de 2, 3, 4 o más tipos diferentes de colágenos.

#### **Colágeno recombinante.**

65 Se conoce la expresión recombinante de colágeno y proteínas similares al colágeno de Bell, documento EP 1232182B1, *Colágeno bovino y procedimiento para producir gelatina recombinante*; Olsen, et al., la patente de Estados Unidos n.º 6,428,978, *Procedimientos para la producción de gelatina y colágeno de triple hélice de longitud completa*

en células recombinantes; VanHeerde, et al., patente de Estados Unidos n.º 8,188,230, *Procedimiento para la expresión de microorganismos recombinantes y aislamiento de polipéptidos similares al colágeno*. Tales colágenos recombinantes no se han usado para producir cuero.

5 Expresión procariota. En sistemas procariotas, tales como sistemas bacterianos, se pueden seleccionar ventajosamente varios vectores de expresión dependiendo del uso previsto para el polipéptido expresado. Por ejemplo, cuando se van a producir grandes cantidades de colágenos y gelatinas animales de la divulgación, tal como para la generación de anticuerpos, se pueden desear vectores que dirijan la expresión de elevados niveles de productos de proteínas de fusión que se purifiquen fácilmente. Dichos vectores incluyen, pero sin limitación, el vector de expresión en *E. coli* pUR278 (Ruther et al. (1983) EMBO J. 2:1791), en el que la secuencia codificante puede ligarse en el vector en marco con la región codificante lac Z de tal manera que se produce una proteína AS-lacZ híbrida; vectores pIN (Inouye et al. (1985) Nucleic Acids Res. 13:3101-3109 y Van Heeke et al. (1989) J. Biol. Chem. 264:5503-5509); y similares. Se pueden usar también vectores pGEX para expresar los polipéptidos foráneos como proteínas de fusión con glutatión S-transferasa (GST). Generalmente, tales proteínas de fusión son solubles y pueden purificarse con facilidad a partir de células lisadas mediante adsorción en perlas de glutatión-agarosa, seguida por elución en presencia de glutatión libre. Los vectores pGEX están diseñados para incluir sitios de escisión de la proteasa de la trombina o de la proteasa del factor Xa de tal manera que el polipéptido clonado de interés puede liberarse del resto GST. Un colágeno recombinante puede comprender moléculas de colágeno que no han sido modificadas postraduccionalmente, *por ejemplo*, no glicosiladas ni hidroxiladas, o puede comprender una o más modificaciones postraduccionales, por ejemplo, modificaciones que facilitan la fibrilación y la formación de fibrillas de colágeno no agrupadas y orientadas al azar.

Una molécula de colágeno recombinante puede comprender un fragmento de la secuencia de aminoácidos de una molécula de colágeno nativa que puede formar fibrillas de colágeno triméricas o una molécula de colágeno modificada o una molécula de colágeno truncada que tiene una secuencia de aminoácidos al menos 70, 80, 90, 95, 96, 97, 98 o 99 % idéntica o similar a una secuencia de aminoácidos de colágeno nativo (o a una región de formación de fibrillas de la misma o a un segmento que comprende sustancialmente [Gly-X-Y]<sub>n</sub>), tales como los del colágeno bovino, descrito por las SEQ ID NO: 1, 2 o 3 y por secuencias de aminoácidos de Col1A1, Col1A2 y Col1A3, descritas por los números de acceso NP\_001029211.1 (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/protein/77404252>, último acceso el 9 de febrero de 2017), NP\_776945.1 (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/protein/27806257> último acceso el 9 de febrero de 2017) y NP\_001070299.1 (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/protein/116003881> último acceso el 9 de febrero de 2017) (Estos enlaces se han inactivado mediante la inclusión de un subrayado después de la doble barra).

Dichas moléculas de colágeno recombinantes o modificadas comprenderán generalmente la secuencia repetida -(Gly-X-Y)<sub>n</sub> descrita en el presente documento.

BLASTN puede usarse para identificar una secuencia de polinucleótidos que tiene al menos 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 87,5 %, 90 %, 92,5 %, 95 %, 97,5 %, 98 % o 99 % de identidad de secuencia con un polinucleótido de referencia, tal como un polinucleótido que codifica un polipéptido de colágeno o que codifica las secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO: 1, 2 o 3. Una configuración BLASTN representativa optimizada para encontrar secuencias muy similares utiliza un umbral esperado de 10 y un tamaño de palabras de 28, coincidencias máximas en el intervalo de consulta de 0, puntuaciones de coincidencia/no coincidencia de 1/-2 y coste de brecha lineal. Las regiones de baja complejidad se pueden filtrar o enmascarar. La configuración predeterminada de un nucleótido estándar BLAST se describe en [https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?PROGRAM=blastn&PAGE\\_TYPE=BlastSearch&LINK\\_LOC=blasthome](https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?PROGRAM=blastn&PAGE_TYPE=BlastSearch&LINK_LOC=blasthome) (último acceso el 27 de enero de 2017).

BLASTP puede usarse para identificar una secuencia de aminoácidos que tiene al menos un 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 87,5 %, 90 %, 92,5 %, 95 %, 97,5 %, 98 % o 99 % de identidad de secuencia, o similitud con un aminoácido de referencia, tal como una secuencia de aminoácidos de colágeno, usando una matriz de similitud como BLOSUM45, BLOSUM62 o BLOSUM80, donde BLOSUM45 puede usarse para secuencias estrechamente relacionadas, BLOSUM62 para secuencias de rango medio, y BLOSUM80 para secuencias relacionadas más distantes. A menos que se indique lo contrario, una puntuación de similitud se basará en el uso de BLOSUM62. Cuando se usa BLASTP, el porcentaje de similitud se basa en la puntuación positiva de BLASTP y el porcentaje de identidad de secuencia se basa en la puntuación de identidades BLASTP. Las "identidades" BLASTP muestra el número y la fracción de residuos totales en los pares de secuencia de alta puntuación que son idénticos; y los "Positivos" BLASTP muestra el número y fracción de residuos para los que las puntuaciones de alineación tienen valores positivos y que son similares entre sí. Las secuencias de aminoácidos que tienen estos grados de identidad o similitud o cualquier grado intermedio de identidad o similitud con las secuencias de aminoácidos desveladas en el presente documento se contemplan y abarcan en esta divulgación. Una configuración representativa de BLASTP que utiliza un umbral esperado de 10, un tamaño de palabra de 3, BLOSUM 62 como matriz y penalización por hueco de 11 (Existencia) y 1 (Extensión) y un ajuste de matriz de puntuación de composición condicional. Otras configuraciones predeterminadas para BLASTP se describen en la divulgación disponible en: [https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?PROGRAM=blastp&PAGE\\_TYPE=BlastSearch&LINK\\_LOC=blasthome](https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?PROGRAM=blastp&PAGE_TYPE=BlastSearch&LINK_LOC=blasthome) (último acceso el 27 de enero de 2017).

65 **Expresión en levadura.** En una realización, las moléculas de colágeno se producen en un sistema de expresión de

levadura. En levaduras, se pueden usar varios vectores que contienen promotores constitutivos o inducibles conocidos en la técnica; Ausubel et al., citado anteriormente, Vol. 2, Capítulo 13; Grant et al. (1987) Expression and Secretion Vectors for Yeast, en Methods in Enzymology, Ed. Wu y Grossman, Acad. Press, N.Y. 153:516-544; Glover (1986) DNA Cloning, Vol. II, IRL Press, Wash., D.C., Cap. 3; Bitter (1987) Heterologous Gene Expression in Yeast, en Methods in Enzymology, Eds. Berger y Kimmel, Acad. Press, N.Y. 152:673-684; y The Molecular Biology of the Yeast *Saccharomyces*, Eds. Strathern et al., Cold Spring Harbor Press, Vols. I y II (1982).

El colágeno se puede expresar usando células huésped, por ejemplo, de la levadura *Saccharomyces cerevisiae*. Esta levadura particular puede usarse con cualquiera de una gran cantidad de vectores de expresión. Los vectores de expresión empleados habitualmente son vectores lanzadera que contienen el origen de replicación 2P para propagación en levadura y el origen Col E1 para *E. coli*, para la transcripción eficiente del gen extraño. Un ejemplo típico de tales vectores basados en plásmidos 2P es pWYG4, que tiene los elementos 2P ORI-STB, el promotor GAL1-10 y el terminador del gen 2P D. En este vector, se usa un sitio de clonación para NcoI para insertar el gen del polipéptido que se va a expresar, y para proporcionar el codón de iniciación ATG. Otro vector de expresión es pWYG7L, que tiene un 2 $\alpha$ ORI, STB, REP1 y REP2 intactos, y el promotor GAL1-10, y usa el terminador FLP. En este vector, el polinucleótido codificante se inserta en el polienlazador con sus extremos 5' en un sitio BamHI o NcoI. El vector que contiene el polinucleótido insertado se transforma en *S. cerevisiae* después de la eliminación de la pared celular para producir esferoplastos que absorben el ADN mediante tratamiento con calcio y polietilenglicol o mediante el tratamiento de las células intactas con iones de litio.

Como alternativa, el ADN puede introducirse mediante electroporación. Los transformantes se pueden seleccionar, por ejemplo, usando células de levadura huésped que son auxotróficas para leucina, triptófano, uracilo o histidina, junto con genes marcadores seleccionables tales como LEU2, TRP1, URA3, HIS3 o LEU2-D.

En una realización, los polinucleótidos que codifican colágeno se introducen en las células huésped de la levadura *Pichia*. Las especies de levadura no *Saccharomyces*, tales como *Pichia pastoris*, parecen tener ventajas especiales en la producción de altos rendimientos de proteína recombinante en procedimientos ampliados. Además, un kit de expresión de *Pichia* está disponible de Invitrogen Corporation (San Diego, CA).

Hay varios genes sensibles al metanol en levaduras metilotróficas tales como *Pichia pastoris*, estando la expresión de cada uno controlada por regiones reguladoras sensibles al metanol, también conocidas como promotores. Cualquiera de dichos promotores sensibles al metanol es adecuado para su uso en la práctica de la presente invención. Los ejemplos de regiones reguladoras específicas incluyen el promotor AOX1, el promotor AOX2, la dihidroxiacetona sintasa (DAS), el promotor P40 y el promotor para el gen catalasa de *P. pastoris*, etc.

En otras realizaciones, se utiliza la levadura metilotrófica *Hansenula polymorpha*. El crecimiento en metanol da como resultado la inducción de enzimas clave del metabolismo del metanol, tales como MOX (metanol oxidasa), DAS (dihidroxiacetona sintasa) y FMHD (formiato deshidrogenasa). Estas enzimas pueden constituir hasta el 30-40 % de la proteína celular total. Los genes que codifican la producción de MOX, DAS y FMDH están controlados por promotores fuertes inducidos por el crecimiento en metanol y reprimidos por el crecimiento en glucosa. Cualquiera o estos tres promotores pueden usarse para obtener un nivel elevado de expresión de genes heterólogos en *H. polymorpha*. Por lo tanto, en un aspecto, un polinucleótido que codifica colágeno animal o fragmentos o variantes del mismo se clona en un vector de expresión bajo el control de un promotor inducible de *H. polymorpha*. Si se desea la secreción del producto, un polinucleótido que codifica una secuencia señal para la secreción en levadura se fusiona en marco con el polinucleótido. En una realización adicional, el vector de expresión contiene, preferentemente, un gen marcador auxotrófico, tal como URA3 o LEU2, que puede usarse para complementar la deficiencia de un huésped auxotrófico.

A continuación, el vector de expresión se usa para transformar células huésped de *H. polymorpha* usando técnicas conocidas por los expertos en la materia. Una característica útil de la transformación de *H. polymorpha* es la integración espontánea de hasta 100 copias del vector de expresión en el genoma. En la mayoría de los casos, el polinucleótido integrado forma multímeros que exhiben una disposición de la cabeza a la cola. Se ha demostrado que el polinucleótido extraño integrado es mitóticamente estable en varias cepas recombinantes, incluso en condiciones no selectivas. Este fenómeno de alta integración de se añade aún más al potencial de alta productividad del sistema.

**Expresión fúngica.** Los hongos filamentosos también pueden usarse para producir los presentes polipéptidos. Los vectores para expresar y/o secretar proteínas recombinantes en hongos filamentosos son bien conocidos y un experto en la técnica podría usar estos vectores para expresar los colágenos animales recombinantes de la presente invención.

**Expresión en plantas.** En un aspecto, un colágeno animal se produce en una planta o células vegetales. En los casos en los que se usan vectores de expresión en plantas, la expresión de secuencias que codifican los colágenos de la invención puede estar dirigida por cualquiera de varios promotores. Por ejemplo, se pueden usar promotores virales, tales como los promotores 35S RNA y 19S RNA de CaMV (Brisson et al. (1984) Nature 310:511-514), o el promotor de la proteína de la cubierta del TMV (Takamatsu et al. (1987) EMBO J. 6:307-311); como alternativa, se pueden usar promotores vegetales como la subunidad pequeña de RUBISCO (Coruzzi et al. (1984) EMBO J. 3:1671-1680; (1984) Science 224: 838-843) o promotores del choque térmico, por ejemplo, hsp17.5-E o hsp17.3-B de soja (Gurley et al.

- (1986) *Mol. Cell. Biol.* 6: 559-565). Estas construcciones pueden introducirse en células vegetales mediante diversos procedimientos conocidos por los expertos en la materia, tal como mediante el uso de plásmidos Ti, plásmidos Ri, vectores de virus vegetales, transformación directa del ADN, microinyección, electroporación, etc. Para revisiones de tales técnicas véase, por ejemplo, Weissbach y Weissbach, *Methods for Plant Molecular Biology*, Academic Press, NY, Sección VIII, pp. 421-463 (1988); Grierson y Corey, *Plant Molecular Biology*, 2ª Ed., Blackie, London, Cap. 7-9 (1988); *Transgenic Plants: A Production System for Industrial and Pharmaceutical Proteins*, Owen y Pen eds., John Wiley & Sons, 1996; *Transgenic Plants*, Galun y Breiman eds, Imperial College Press, 1997; and *Applied Plant Biotechnology*, Chopra, Malik y Bhat eds., Science Publishers, Inc., 1999.
- 10 Las células vegetales no producen de forma natural cantidades suficientes de enzimas postraduccionales para producir colágeno estable de manera eficiente. Por lo tanto, cuando se desea la hidroxilación, las células vegetales utilizadas para expresar colágenos animales se complementan con las enzimas postraduccionales necesarias para producir suficiente colágeno estable. En una realización preferida de la presente invención, la enzima postraducciona
- 15 es prolil 4-hidroxilasa.
- Los procedimientos para producir los presentes colágenos animales en sistemas vegetales pueden lograrse proporcionando una biomasa de plantas o células vegetales, en los que las plantas o las células vegetales comprenden al menos una secuencia de codificación que está operativamente unida a un promotor para efectuar la expresión del polipéptido y el polipéptido se extrae de la biomasa. Como alternativa, el polipéptido puede ser no extraído, por
- 20 ejemplo, expresado en el endospermo.
- Los vectores de expresión de plantas y los genes indicadores son generalmente conocidos en la técnica; véase, por ejemplo, Gruber et al. (1993) in *Methods of Plant Molecular Biology and Biotechnology*, CRC Press. Generalmente, el vector de expresión comprende una construcción de ácido nucleico generada, por ejemplo, de forma recombinante o
- 25 sintética, y que comprende un promotor que funciona en una célula vegetal, en la que dicho promotor está operativamente unido a una secuencia de ácido nucleico que codifica un colágeno animal o fragmentos o variantes del mismo, o una enzima postraducciona
- Los promotores dirigen el nivel de expresión proteica en las plantas. Para producir un nivel deseado de expresión de proteínas en plantas, la expresión puede estar bajo la dirección de un promotor vegetal. Los promotores adecuados para su uso de acuerdo con la presente invención están generalmente disponibles en la técnica; véase, por ejemplo, la publicación PCT n.º WO 91/19806. Los ejemplos de promotores que pueden usarse de acuerdo con la presente invención incluyen promotores no constitutivos o promotores constitutivos. Estos promotores incluyen, pero sin
- 30 limitación, el promotor de la subunidad pequeña de la ribulosa-1,5-bis-fosfato carboxilasa; promotores de plásmidos inductores de tumores de *Agrobacterium tumefaciens*, tales como los promotores de RUBISCO nopalina sintasa (NOS) y octopina sintasa; promotores de ADN-T bacterianos, tales como los promotores mas y ocs; y promotores virales, tales como los promotores 19S y 35S del virus del mosaico de la coliflor (CaMV) o el promotor 35S del virus del
- 35 mosaico de la higuera.
- Las secuencias de polinucleótidos de la presente divulgación pueden colocarse bajo el control transcripcional de un promotor constitutivo, dirigiendo la expresión del colágeno o la enzima postraducciona
- 40 en la mayoría de los tejidos de una planta. En una realización, la secuencia de polinucleótidos está bajo el control del promotor 35S del virus del mosaico de la coliflor (CaMV). La familia de caulimovirus bicatenarios ha proporcionado la expresión del promotor simple más importante para la expresión transgénica en plantas, en particular, el promotor 35S; véase, por ejemplo, Kay et al. (1987) *Science* 236:1299. Los promotores adicionales de esta familia, como el promotor del virus del mosaico de la higuera, etc., se han descrito en la técnica y también se pueden usar; véase, por ejemplo, Sanger *et al.* (1990) *Plant Mol. Biol.* 14:433-443; Medberry et al. (1992) *Plant Cell* 4:195-192; y Yin y Beachy (1995) *Plant J.* 7:969-980.
- 45 Los promotores utilizados en las construcciones de polinucleótidos para expresar colágeno pueden modificarse, si se desea, para afectar a sus características de control. Por ejemplo, el promotor del CaMV puede estar ligado a la porción del gen RUBISCO que reprime la expresión de RUBISCO en ausencia de luz, para crear un promotor que esté activo en las hojas, pero no en las raíces. El promotor quimérico resultante puede usarse como se ha descrito en el presente documento.
- 50 Los promotores vegetales constitutivos que tienen propiedades de expresión generales conocidas en la técnica pueden usarse con los vectores de expresión de la presente invención. Estos promotores se expresan abundantemente en la mayoría de los tejidos vegetales e incluyen, por ejemplo, el promotor de actina y el promotor de ubiquitina; véase, por ejemplo, McElroy et al. (1990) *Plant Cell* 2:163-171; y Christensen et al. (1992) *Plant Mol. Biol.* 18:675-689.
- 55 Como alternativa, el polipéptido de la presente divulgación puede expresarse en un tejido específico, un tipo de célula, o en condiciones ambientales más precisas o bajo control del desarrollo. Los promotores que dirigen la expresión en estos casos se conocen como promotores inducibles. En el caso en el que se usa un promotor específico de tejido, la expresión de proteínas es particularmente alta en el tejido del que se desea la extracción de la proteína. Dependiendo del tejido deseado, la expresión puede estar dirigida al endospermo, la capa de aleurona, el embrión (o sus partes como el escutelo y los cotiledones), el pericarpio, el tallo, las hojas y los tubérculos, las raíces, etc. Los ejemplos de
- 60
- 65

promotores específicos de tejido conocidos incluyen el promotor de patatina de clase I dirigido por tubérculos, los promotores asociados con los genes ADPGPP del tubérculo de patata, el promotor de soja de  $\beta$ -conglucina (proteína 7S) que dirige la transcripción dirigida a la semilla y los promotores dirigidos a la semilla de los genes zeína del endospermo de maíz; véase, por ejemplo, Bevan et al. (1986) *Nucleic Acids Res.* 14: 4625-38; Muller et al. (1990) *Mol. Gen. Genet.* 224:136-46; Bray (1987) *Planta* 172: 364-370; yedersen et al. (1982) *Cell* 29:1015-26.

Los polipéptidos de colágeno se pueden producir en semillas mediante técnicas de producción basadas en semillas utilizando, por ejemplo, semillas de canola, maíz, soja, arroz y de cebada. En tal proceso, por ejemplo, el producto se recupera durante la germinación de la semilla; véase, por ejemplo, los números de publicación PCT WO 9940210; WO 9916890; WO 9907206; la patente de Estados Unidos n.º 5,866,121; patente de Estados Unidos n.º 5,792,933; y todas las referencias citadas en ellos. Los promotores que pueden usarse para dirigir la expresión de los polipéptidos pueden ser heterólogos o no heterólogos. Estos promotores también se pueden usar para dirigir la expresión de ácidos nucleicos antisentido para reducir, aumentar o alterar la concentración y composición de los presentes colágenos animales en un tejido deseado.

Otras modificaciones que se pueden hacer para aumentar y/o maximizar la transcripción de los polipéptidos presentes en una planta o célula vegetal son estándar y conocidas por los expertos en la técnica. Por ejemplo, un vector que comprende una secuencia de polinucleótidos que codifica un colágeno animal recombinante, o un fragmento o variante del mismo, unido operativamente a un promotor puede comprender además al menos un factor que modifica la velocidad de transcripción de colágeno o enzimas postraduccionales relacionadas, incluyendo, pero sin limitación, la secuencia de señal de exportación de péptidos, el uso de codones, los intrones, la poliadenilación y los sitios de terminación de la transcripción. Los procedimientos de modificación de construcciones para aumentar los niveles de expresión en plantas son generalmente conocidos en la técnica; véase, por ejemplo, Rogers et al. (1985) *J. Biol. Chem.* 260:3731; y Comejo et al. (1993) *Plant Mol Biol* 23:567-58. En la ingeniería de un sistema vegetal que afecta a la velocidad de transcripción de los colágenos presentes y las enzimas postraduccionales relacionadas, diversos factores conocidos en la técnica, incluyendo secuencias reguladoras tales como secuencias de acción positiva o negativa, potenciadores y silenciadores, así como la estructura de la cromatina puede afectar a la velocidad de transcripción en las plantas. al menos uno de estos factores puede utilizarse cuando se expresa un colágeno animal recombinante, incluidos, entre otros, los tipos de colágeno descritos anteriormente.

Los vectores que comprenden los presentes polinucleótidos comprenderán normalmente un gen marcador que confiere un fenotipo seleccionable en células vegetales. Normalmente, el gen marcador seleccionable codificará la resistencia a los antibióticos, con genes adecuados que incluyen al menos un conjunto de genes que codifican la resistencia al antibiótico espectinomicina, el gen de la estreptomycin fosfotransferasa (SPT) que codifica la resistencia a estreptomycin, el gen de la neomicina fosfotransferasa (NPTII) que codifica la resistencia a kanamicina o geneticina, la resistencia a higromicina, genes que codifican la resistencia a herbicidas que actúan inhibiendo la acción de la acetolactato sintasa (ALS), en particular, los herbicidas de tipo sulfonilurea; por ejemplo, el gen de acetolactato sintasa (ALS) que contiene mutaciones que conducen a dicha resistencia, en particular las mutaciones S4 y/o Hra, genes que codifican la resistencia a herbicidas que actúan inhibiendo la acción de la glutamina sintasa, tales como fofinotricina o basta; por ejemplo, el gen bar u otros genes similares conocidos en la técnica. El gen bar codifica resistencia al herbicida basta, el gen nptII codifica resistencia a los antibióticos kanamicina y geneticina y el gen ALS codifica resistencia al herbicida clorsulfurón.

Los vectores típicos útiles para la expresión de genes extraños en plantas son bien conocidos en la técnica, incluyendo, pero sin limitación, vectores derivados del plásmido inductor de tumores (Ti) de *Agrobacterium tumefaciens*. Estos vectores son vectores integradores de plantas que, tras la transformación, integran una porción del ADN en el genoma de la planta huésped; véase, por ejemplo, Rogers et al. (1987) *Meth In Enzymol.* 153:253-277; Schardl et al. (1987) *Gene* 61:1-11; y Berger et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 86:8402-8406.

Los vectores que comprenden secuencias que codifican los presentes polipéptidos y los vectores que comprenden enzimas postraduccionales o subunidades de los mismos pueden introducirse conjuntamente en la planta deseada. Los procedimientos para transformar células vegetales están disponibles en la técnica, por ejemplo, transferencia directa de genes, transformación de protoplastos *in vitro*, transformación mediada por virus vegetales, transformación mediada por liposomas, microinyección, electroporación, transformación mediada por *Agrobacterium* y bombardeo de partículas; véase, por ejemplo, Paszkowski et al. (1984) *EMBO J.* 3:2717-2722; patente de Estados Unidos n.º 4,684,611; solicitud europea N.º 0 67 553; patente de Estados Unidos n.º 4,407,956; patente de Estados Unidos n.º 4,536,475; Crossway et al. (1986) *Biotechniques* 4:320-334; Riggs et al. (1986) *Proc. Natl. Acad. Sci USA* 83:5602-5606; Hinchee et al. (1988) *Biotechnology* 6:915-921; y la patente de Estados Unidos n.º 4.945.050). En la técnica se describen procedimientos convencionales para la transformación de, por ejemplo, arroz, trigo, maíz, sorgo y cebada; véase, por ejemplo, Christou et al. (1992) *Trends in Biotechnology* 10: 239 and Lee et al. (1991) *Proc. Nat'l Acad. Sci. USA* 88:6389. El trigo puede transformarse mediante técnicas similares a las empleadas para transformar el maíz o el arroz. Asimismo, Casas et al. (1993) *Proc. Nat'l Acad. Sci. USA* 90:11212, describen un procedimiento para transformar el sorgo, mientras que Wan et al. (1994) *Plant Physiol.* 104: 37, enseñan un procedimiento para transformar la cebada. Fromm et al. (1990) *Bio/Technology* 8:833 and by Gordon-Kamm et al. proporcionan procedimientos adecuados para la transformación de maíz, anteriormente citado.

En la técnica se establecen procedimientos adicionales que pueden usarse para generar plantas que producen colágenos animales de la presente divulgación; véase, por ejemplo, la patente de Estados Unidos n.º 5,959,091; la patente de Estados Unidos n.º 5,859,347; la patente de Estados Unidos n.º 5,763,241; la patente de Estados Unidos n.º 5,659,122; la patente de Estados Unidos n.º 5,593,874; la patente de Estados Unidos n.º 5,495,071; la patente de Estados Unidos n.º 5,424,412; la patente de Estados Unidos n.º 5,362,865; la patente de Estados Unidos n.º 5,229,112; la patente de Estados Unidos n.º 5,981,841; la patente de Estados Unidos n.º 5,959,179; la patente de Estados Unidos n.º 5,932,439; la patente de Estados Unidos n.º 5,869,720; la patente de Estados Unidos n.º 5,804,425; la patente de Estados Unidos n.º 5,763,245; la patente de Estados Unidos n.º 5,716,837; la patente de Estados Unidos n.º 5,689,052; la patente de Estados Unidos n.º 5,633,435; la patente de Estados Unidos n.º 5,631,152; la patente de Estados Unidos n.º 5,627,061; la patente de Estados Unidos n.º 5,602,321; la patente de Estados Unidos n.º 5,589,612; la patente de Estados Unidos n.º 5,510,253; la patente de Estados Unidos n.º 5,503,999; la patente de Estados Unidos n.º 5,378,619; la patente de Estados Unidos n.º 5,349,124; la patente de Estados Unidos n.º 5,304,730; la patente de Estados Unidos n.º 5,185,253; la patente de Estados Unidos n.º 4,970,168; la publicación Europea n.º EPA 00709462; la publicación Europea n.º EPA 00578627; la publicación Europea n.º EPA 00531273; la publicación Europea n.º EPA 00426641; la publicación PCT n.º WO 99/31248; la publicación PCT n.º WO 98/58069; la publicación PCT n.º WO 98/45457; la publicación PCT n.º WO 98/31812; la publicación PCT n.º WO 98/08962; la publicación PCT n.º WO 97/48814; la publicación PCT n.º WO 97/30582; y la publicación PCT n.º WO 9717459.

**Expresión en insectos.** Otro sistema de expresión alternativo para el colágeno es un sistema de insectos. Los baculovirus son vectores de expresión muy eficientes para la producción a gran escala de diversas proteínas recombinantes en células de insecto. Los procedimientos descritos en Luckow et al. (1989) *Virology* 170:31-39 y Gruenwald, S. y Heitz, J. (1993) *Baculovirus Expression Vector System: Procedures & Methods Manual*, Pharmingen, San Diego, CA, pueden emplearse para construir vectores de expresión que contienen una secuencia de codificación de colágeno para los colágenos de la invención y las señales de control transcripcional/traduccionales apropiadas. Por ejemplo, la producción recombinante de proteínas se puede lograr en células de insectos, por infección de vectores de baculovirus que codifican el polipéptido. La producción de colágeno recombinante, polipéptidos de tipo colágeno o colagenosos con triples hélices estables pueden implicar la coinfección de células de insecto con tres baculovirus, uno codifica el colágeno animal que se va a expresar y cada uno codifica la subunidad  $\alpha$  y la subunidad  $\beta$  de la prolil 4-hidroxilasa. Este sistema de células de insecto permite la producción de proteínas recombinantes en grandes cantidades. En un sistema de este tipo, se usa el virus de la polihedrosis nuclear de *Autographa californica* (AcNPV) como un vector para expresar genes extraños. Este virus crece en células de *Spodoptera frugiperda*. Las secuencias de codificación para polipéptidos de tipo colágeno o colagenosos pueden clonarse en regiones no esenciales (por ejemplo, el gen del poliedro) del virus y colocarse bajo el control de un promotor AcNPV (por ejemplo, el promotor poliedro). La inserción con éxito de una secuencia de codificación dará como resultado la inactivación del gen del poliedro y la producción de virus recombinante no oculto; por ejemplo, virus que carecen del recubrimiento proteico codificado por el gen del poliedro. Estos virus recombinantes se usan después para infectar células de *Spodoptera frugiperda* en las que se expresa el gen insertado; véase, por ejemplo, Smith et al. (1983) *J. Virol.* 46:584; y la patente de Estados Unidos n.º 4,215,051. Se pueden encontrar más ejemplos de este sistema de expresión en, por ejemplo, Ausubel et al. anterior.

**Expresión en animales.** En células huésped animales, se pueden utilizar numerosos sistemas de expresión. En casos donde se usa un adenovirus como vector de expresión, las secuencias de polinucleótidos que codifican colágeno o polipéptidos similares al colágeno pueden ligarse a un complejo de control de transcripción/traducción de adenovirus, por ejemplo, el promotor tardío y la secuencia líder tripartita. A continuación, se puede insertar este gen quimérico en el genoma del adenovirus mediante recombinación *in vitro* o *in vivo*. La inserción de una región no esencial del genoma del virus (por ejemplo, región E1 o E3) dará como resultado un virus recombinante que es viable y puede expresar los polipéptidos codificados en hospedadores infectados; véase, por ejemplo, Logan y Shenk, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 81:3655-3659 (1984). Como alternativa, se puede usar el promotor de vaccinia 7.5 K; véase, por ejemplo, Mackett et al. (1982) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 79:7415-7419; Mackett et al. (1982) *J. Virol.* 49:857-864; y Panicali et al. (1982) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 79:4927-4931.

Un sistema de expresión preferido en células huésped de mamíferos es el virus del bosque Semliki. La infección de células huésped de mamíferos, por ejemplo, células de riñón de hámster neonato (BHK) y células de ovario de hámster chino (CHO) pueden producir niveles de expresión recombinante muy altos. El virus del bosque Semliki es un sistema de expresión preferido, ya que el virus tiene un amplio rango de hospedadores, de modo que será posible la infección de líneas celulares de mamíferos. Más específicamente, el virus del bosque Semliki se puede usar en una amplia gama de huéspedes, ya que el sistema no se basa en la integración cromosómica y, por lo tanto, proporciona una forma más fácil de obtener modificaciones de los colágenos animales recombinantes en estudios dirigidos a identificar las relaciones de función de estructura y probar los efectos de diversas moléculas híbridas. Los procedimientos para construir vectores del virus del bosque Semliki para la expresión de proteínas exógenas en células huésped de mamífero se describen en, por ejemplo, Olkkonen et al. (1994) *Methods Cell Biol.* 43:43-53.

Los animales transgénicos no humanos también pueden usarse para expresar los polipéptidos de la presente divulgación. Dichos sistemas pueden construirse uniendo operativamente el polinucleótido de la invención a un promotor, junto con otras secuencias reguladoras requeridas u opcionales capaces de efectuar la expresión en las glándulas mamarias. Del mismo modo, las enzimas postraduccionales requeridas u opcionales pueden producirse

simultáneamente en las células diana empleando sistemas de expresión adecuados. En la técnica se conocen procedimientos para el uso de animales transgénicos no humanos para producir proteínas de forma recombinante; véase, por ejemplo, la patente de Estados Unidos n.º 4,736,866; la patente de Estados Unidos n.º 5,824,838; la patente de Estados Unidos n.º 5,487,992; y la patente de Estados Unidos n.º 5,614,396.

5 **Láminas de fibra de colágeno compuesto.** Tal como se muestra en la figura 1, las moléculas de colágeno de triple hélice se asocian en fibrillas que, en la piel de los animales, se ensamblan en haces de fibrillas más grandes o fibras de colágeno. Los procedimientos anteriores para hacer láminas de colágeno usaban una mezcla de piel de animal  
10 molida o restos de cuero y colágeno disuelto o suspendido. Tales productos que contienen fibra de colágeno se describen en el documento EP0089029, las patentes de Estados Unidos n.º 2,934,446; 3,073,714; 3,122, 599; y 3.136.682. Highberger et al., la patente de Estados Unidos número 2.934.446 describe un procedimiento que usa una picadora de carne para producir una suspensión de pellejo de piel de becerro o corium que se forma en una lámina, curtida y para formar masas de fibras de colágeno entrelazadas mediante trituración y dispersión de la piel del animal  
15 en una solución acuosa ácida a 5 °C y, a continuación. elevar el pH y la temperatura para precipitar las fibras de colágeno para formar un gel que luego se seca. Estas láminas de masas de fibra de colágeno utilizan restos de cuero y forman láminas que se asemejan al cuero. Highberger no muestra que estas láminas de cuero sean adecuadas para uso comercial. Tu, et al., la patente de Estados Unidos n.º 3,073,714 desvela la producción de una lámina a partir de una suspensión de piel de becerro que contiene 25 % de sólidos que se curtió con una solución de curtido vegetal y se trató con glicerina y ácido oleico. Se describe que estas láminas de fibra de colágeno reproducen la disposición  
20 interna de las fibras de colágeno en pieles y pellejos naturales. Tu no muestra que las láminas de cuero sean adecuadas tanto en composición como estética para su uso en un producto de consumo. Tu, et al., patente de Estados Unidos n.º 3,122,599 describe una lámina similar al cuero hecha de piel de animal molida o cuero que contiene fibras de colágeno y colágeno soluble, así como otros componentes derivados de la piel de animal. Tu desvela el tratamiento de esta mezcla con cromo, deshidratación con acetona y tratamiento con ácido oleico para producir un producto similar al cuero que contiene masas de fibra de colágeno. Tu no muestra que la hoja es adecuada en cuanto a composición,  
25 física o estéticamente para su uso en un producto de consumo. Tu, et al., patente de Estados Unidos n.º 3,136,682 describe un proceso de fabricación de un material similar al cuero que contiene una mezcla de fibras de colágeno y un aglutinante de material proteico soluble en agua derivado de piel animal. También describe el uso de un agente de curtido de cromo y el tratamiento con ácido oleico. Tu describe una lámina de buena apariencia y tacto, pero no muestra que sea adecuado para su incorporación en un producto de consumo. Estos productos incorporan fibras de colágeno gruesas, molidas o digeridas.

**Productos de cuero cultivado.** Estos productos que generalmente comprenden una pluralidad de capas que contienen colágeno producido por el cultivo de células *in vitro* se describen en Forgacs, et al., U.S. 2016/0097109 A1  
35 y en Greene, patente de Estados Unidos n.º 9,428,817 B2. Estos productos se producen *in vitro* mediante el cultivo de explantes celulares o células productoras de colágeno cultivadas. Dichas células producen y procesan colágeno en haces cuaternarios de fibrillas de colágeno y no tienen la estructura no anisotrópica aleatoria de las fibrillas de colágeno de la invención. Forgacs describe pieles de animales modificadas por ingeniería, a las que se puede dar forma para producir un producto de cuero. Green describe diversos productos, tales como calzado, prendas de ropa y equipaje  
40 que pueden incorporar cuero que se cultiva *in vitro*. El documento US 2013/0255003 describe la producción de colágeno para productos similares al cuero mediante el cultivo de células de piel bovina en cultivo. Se han utilizado otros tipos de células huésped para producir colágeno para implantes médicos o para producir gelatina. Por ejemplo, la solicitud de patente de Estados Unidos US 2004/0018592 describe una forma de producir gelatina mediante la expresión recombinante de colágeno bovino en células huésped, tales como levadura.

45 **Productos médicos.** Se han producido redes de colágeno *in vitro* como materiales para aplicaciones biomédicas. En esas aplicaciones, los monómeros de la triple hélice de colágeno se extraen de tejido animal, tal como dermis bovina, ya sea por tratamiento ácido o tratamiento con enzimas degradantes de proteínas, tales como pepsina, para solubilizar el colágeno del tejido. Una vez purificados, estos colágenos solubilizados (a menudo mezclas de monómeros, dímeros  
50 y trímeros de la triple hélice de colágeno) pueden fibrilarse en fibrillas a través de un cambio de pH en tampones acuosos. En las condiciones adecuadas, los monómeros de colágeno se autoensamblan en fibrillas y, dependiendo de su fuente y de cómo se aislaron, las fibrillas pueden reticularse físicamente para formar un hidrogel sólido. Además, se ha demostrado que los colágenos recombinantes y las proteínas similares al colágeno fibrilan *in vitro* a través de ajustes similares en el pH y la concentración de sal. Los ejemplos de tales productos para aplicaciones médicas  
55 incluyen una matriz de colágeno biodegradable hecha de una suspensión de colágeno que se autoensambla en fibras de colágeno macroscópicas. La patente de Estados Unidos n.º 9,539,363 y una matriz organizada de fibrillas de colágeno producidas mediante el uso de estructuras de guía externas o plantillas internas y la aplicación de tensión, la patente de Estados Unidos n.º 9.518.106. Los productos de colágeno utilizados en medicina, tales como para ingeniería de tejidos o injertos, a menudo tienen como objetivo proporcionar colágeno en una forma similar a la de un  
60 tejido particular que se está diseñando o reparando. Si bien la fibrilación de colágenos solubles y proteínas similares al colágeno se ha explorado para producir hidrogeles de colágeno para aplicaciones biomédicas, Esta tecnología no se ha aplicado con éxito a la producción de un material que tenga la resistencia y las propiedades estéticas del cuero natural.

65 **Cueros sintéticos a base de plástico.** Los intentos de crear cuero sintético han fallado en reproducir el conjunto único de propiedades funcionales y estéticas del cuero. Los ejemplos de materiales de cuero sintético incluyen Clarino,

Naugahyde®, Corfam y Alcantara, entre otros. Están hechos de varios ingredientes químicos y poliméricos, incluyendo cloruro de polivinilo, poliuretano, tela de algodón recubierta de nitrocelulosa, poliéster u otro material natural de tela o fibra recubierto con un polímero sintético. Estos materiales se ensamblan utilizando diversas técnicas, a menudo basándose en enfoques de producción química y textil, incluyendo procesos de hilatura no tejidos y avanzados. Si bien muchos de estos materiales han encontrado uso en el calzado, aplicaciones de tapicería y prendas de ropa, se han quedado cortos para la aplicación en lujo, ya que no pueden igualar la transpirabilidad, las prestaciones, el tacto o las propiedades estéticas que hacen que el cuero sea tan único y querido. Hasta ahora, no se han fabricado materiales comerciales similares al cuero a partir de una red uniforme de colágeno o proteínas similares al colágeno. Los materiales plásticos sintéticos carecen de la composición química y la estructura de una red de colágeno que produce una estética de cuero aceptable. Al contrario que los materiales sintéticos, la composición química de los grupos laterales de aminoácidos a lo largo de la cadena polipeptídica de colágeno, junto con su organización en una arquitectura fibrosa fuerte aunque porosa, permite la estabilización y funcionalización de la red de fibrillas a través de procesos de reticulación para producir la resistencia, la blandura y la estética deseables del cuero.

Si bien se ha explorado la fibrilación de colágenos solubles y proteínas similares al colágeno para unir restos de cuero molido o triturado o para la producción de hidrogeles de colágeno para aplicaciones biomédicas, no se ha logrado aprovechar este fenómeno para producir un material similar al cuero comercialmente aceptable.

En vista de los problemas con los cueros naturales de la técnica anterior, y los productos de cuerpo a base de plástico, compuestos, cultivados y sintéticos, los inventores buscaron diligentemente una manera de proporcionar un cuero biofabricado que tuviera una resistencia y uniformidad superiores y propiedades no anisotrópicas que incorporaran componentes naturales encontrados en el cuero.

En el presente documento se describen materiales compuestos de fibrillas de colágeno fibriladas *in vitro* que tienen propiedades similares al cuero impartidas por reticulación, deshidratación y lubricación. En comparación con los pellejos de animal curtidos y engrasados, estos materiales biofabricados pueden tener uniformidad estructural, compositiva y funcional, por ejemplo, resistencia ventajosa sustancialmente no anisotrópica y otras propiedades mecánicas, así como una estética de grano superior en sus superficies superior e inferior.

### 30 Sumario de la invención

La invención es tal como se define en las reivindicaciones. Entre sus realizaciones, la invención se refiere a un material biofabricado compuesto por una red de fibrillas de colágeno reticuladas y lubricadas, tal como se indica en las reivindicaciones. Se puede producir a partir de colágeno aislado de una fuente animal o colágeno recombinante. Se puede producir a partir de colágenos que no contienen sustancialmente residuos. Está sustancialmente libre de grandes haces de fibras de colágeno. Preferentemente, está sustancialmente libre de otros componentes de cuero que no sean hidroxilisina o que no sean 3-hidroxiprolina colágeno, tal como elastina. Este material está compuesto por colágeno, que también es un componente importante del cuero natural y se produce mediante un proceso de fibrilación de moléculas de colágeno en fibrillas, reticulando y deshidratando las fibrillas y lubricando las fibrillas reticuladas. A diferencia de los cueros naturales, este material biofabricado exhibe propiedades físicas no anisotrópicas (no dependientes de la dirección), por ejemplo, una lámina de material biofabricado puede tener sustancialmente la misma elasticidad o resistencia a la tracción cuando se mide en direcciones diferentes. A diferencia del cuero natural, tiene una textura uniforme que facilita la absorción uniforme de colorantes y recubrimientos. Estéticamente, Produce un grano uniforme y consistente para facilitar la fabricación. Pueden tener propiedades de grano, textura y otras propiedades estéticas sustancialmente idénticas en ambos lados a diferencia de los cueros naturales, en los que el grano aumenta de un lado (por ejemplo, superficie distal) al otro (capas internas proximales).

### Breve descripción de los dibujos

La figura 1 es un dibujo que muestra la composición del colágeno de forma jerárquica. El carácter de referencia (1) muestra cada monómero de colágeno de triple hélice y cómo se ensamblan con respecto a los monómeros de colágeno vecinos; (2) muestra el colágeno ensamblado que forma fibrillas de colágeno en bandas; (3) muestra las fibrillas de colágeno a mayor escala; (4) muestra fibrillas de colágeno alineadas en fibras; y (5) muestra haces de fibras de colágeno.

La figura 2A es una imagen que muestra la composición del cuero de búfalo. Se muestran la capa de grano superior y la capa de corium debajo y se indican los grados relativos de organización de orden superior desde fibrillas de colágeno hasta haces de fibras de colágeno. La capa de grano superior está compuesta principalmente por fibrillas de colágeno finas, mientras que la capa de corium está compuesta principalmente por fibras de colágeno más gruesas y haces de fibras.

Las figuras 2B y 2C comparan las texturas y granos de las superficies externas e internas de cuero que representan grano fino en un lado y corium más grueso en el otro.

La figura 3A es una micrografía electrónica de barrido del hidrogel de colágeno fibrilado que muestra una red de fibrillas de colágeno finas.

La figura 3B es una micrografía electrónica de barrido de corium bovino que muestra haces de fibra más gruesos.

La figura 4 es una micrografía electrónica de transmisión de una red de colágeno fibrilado o hidrogel que muestra bandas de fibrillas.

### Descripción detallada de la invención

5 **"Material biofabricado"** o **"cuero biofabricado"** como se usa en el presente documento es un material producido a partir de colágeno o una proteína similar al colágeno. Se puede producir a partir de colágenos no humanos, tales como colágeno bovino, de búfalo, de buey, de ciervo, de oveja, de cabra o de cerdo, que puede aislarse a partir de una fuente natural como pellejo de animal, mediante cultivo *in vitro* de células de mamíferos o animales, producidos de forma recombinante o sintetizados químicamente. No es un material convencional o cuero que se produce a partir de pieles de animales. Los procedimientos para producir este material biofabricado o cuero biofabricado se desvelan en el presente documento y generalmente implican fibrillar una solución o suspensión aislada o purificada de moléculas de colágeno para producir fibrillas de colágeno, reticulando las fibrillas, deshidratando las fibrillas y lubricando las fibrillas.

10 A diferencia de cueros naturales que exhiben estructuras de colágeno internas heterogéneas, un material biofabricado o cuero biofabricado puede exhibir una estructura interna sustancialmente uniforme caracterizada por fibrillas de colágeno no agrupadas y orientadas aleatoriamente en todo su volumen.

15 El material biofabricado resultante puede usarse de cualquier manera que se use cuero natural y puede ser muy similar en apariencia y tacto al cuero real, al tiempo que tiene características compositivas, funcionales o estéticas que lo diferencian del cuero ordinario. Por ejemplo, a diferencia del cuero natural, un cuero biofabricado no necesita contener proteínas o componentes no colágenos potencialmente alergénicos que se encuentran en un cuero natural, un cuero biofabricado puede exhibir una flexibilidad y resistencia similares en todas las direcciones (sin anisotropía) debido a la no alineación sustancial de sus fibrillas de colágeno, y estéticamente puede tener una textura de grano suave en ambos lados. Un cuero biofabricado puede exhibir uniformidad de propiedades, incluyendo grosor uniforme y consistencia, distribución uniforme de lubricantes, reticulantes y pigmentos, resistencia no anisotrópica uniforme, elasticidad, flexibilidad y resistencia a la formación de tubos (o la tendencia del cuero natural a separarse o dividirse en paralelo al plano de una lámina). Al seleccionar el contenido de colágeno y las condiciones de procesamiento, el cuero biofabricado se puede "ajustar" a un grosor, consistencia, flexibilidad, blandura, caída, textura de la superficial en particular u otra funcionalidad. Los productos laminados, estratificados o compuestos pueden comprender un cuero biofabricado.

20 El término **"colágeno"** se refiere a cualquiera de los tipos de colágeno conocidos, incluidos los tipos de colágeno I a XX, así como a cualquier otro colágeno, ya sea natural, sintético, semisintético o recombinante. Incluye todos los colágenos, colágenos modificados y proteínas similares al colágeno descritas en el presente documento. El término también abarca procolágenos y proteínas similares al colágeno o proteínas colagenosas que comprenden el motivo (Gly-X-Y)<sub>n</sub>, en el que n es un número entero. Abarca moléculas de colágeno y proteínas similares al colágeno, trímeros de moléculas de colágeno, fibrillas de colágeno y fibras de fibrillas de colágeno. También se refiere a colágenos modificados química, enzimática o recombinantemente o moléculas similares al colágeno que pueden fibrillarse, así como a fragmentos de colágeno, moléculas similares a colágeno y moléculas colagenosas capaces de ensamblarse en una nanofibra.

25 En algunas realizaciones, restos de aminoácido, tal como lisina y prolina, en un colágeno o una proteína similar al colágeno puede carecer de hidroxilación o puede tener un grado de hidroxilación menor o mayor que el correspondiente colágeno natural o no modificado o proteína similar al colágeno. En otras realizaciones, los restos de aminoácidos en un colágeno o una proteína similar al colágeno pueden carecer de glucosilación o pueden tener un grado de glucosilación menor o mayor que el correspondiente colágeno natural o no modificado o una proteína similar al colágeno.

30 El colágeno en una composición de colágeno puede contener de manera homogénea un solo tipo de molécula de colágeno, tal como colágeno de tipo I 100 % bovino o colágeno de tipo III 100 % bovino, o puede contener una mezcla de diferentes tipos de moléculas de colágeno o moléculas similares al colágeno, tal como una mezcla de moléculas bovinas de tipo I y de tipo III. Dichas mezclas pueden incluir > 0 %, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 95, 99 o <100 % del colágeno individual o componentes de proteínas similares al colágeno. Este intervalo incluye todos los valores intermedios. Por ejemplo, una composición de colágeno puede contener 30 % de colágeno de tipo I y 70 % de colágeno de tipo III, o puede contener 33,3 % de colágeno de tipo I, 33,3 % de colágeno de tipo II y 33,3 % de colágeno de tipo III, donde el porcentaje de colágeno se basa en la masa total de colágeno en la composición o en los porcentajes moleculares de las moléculas de colágeno.

35 Las **"fibrillas de colágeno"** son nanofibras compuestas por tropocolágeno (triples hélices de moléculas de colágeno). Los tropocolágenos también incluyen estructuras de tipo tropocolágeno que exhiben estructuras de triple hélice. Las fibrillas de colágeno del material de la invención pueden tener diámetros que varían entre 1 nm y 1 μm. Por ejemplo, las fibrillas de colágeno del material de la invención pueden tener un diámetro de fibrilla promedio o individual que varía de 1, 2, 3, 4, 5, 10, 15, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 200, 300, 400, 500, 600, 700, 800, 900 o 1.000 nm (1 μm). Este intervalo incluye todos los valores intermedios y subintervalos. En la invención, las fibrillas de colágeno formarán redes, por ejemplo, como se representa en las figuras 3 y 4. Las fibrillas de colágeno pueden asociarse en fibrillas que exhiben un patrón en bandas como se muestra en la figura 1 pueden asociarse en agregados más grandes

de fibrillas. En algunas realizaciones, el colágeno o las fibrillas de tipo colágeno tendrán diámetros y orientaciones similares a las del grano superior o la capa superficial de un cuero bovino u otro cuero convencional. En otras realizaciones, las fibrillas de colágeno pueden tener diámetros que comprenden el grano superior y los de una capa de corium de un cuero convencional.

5 Una "**fibra de colágeno**" se compone de fibrillas de colágeno que están estrechamente compactadas y exhiben un alto grado de alineación en la dirección de la fibra como se muestra en la figura 1. Puede variar en diámetro de más de 1  $\mu\text{m}$  a más de 10  $\mu\text{m}$ , por ejemplo > 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12  $\mu\text{m}$  o más. Algunas realizaciones de la red de fibrillas de colágeno de la invención no contienen un contenido sustancial de fibras de colágeno contenido sustancial  
10 de fibras de colágeno que tengan diámetros superiores a 5  $\mu\text{m}$ . Como se muestra en la figura 2, la composición de la superficie del grano de un cuero puede diferir de sus partes más internas, tal como el corium que contiene haces de fibra más gruesos.

15 La "**fibrilación**" se refiere a un proceso de producción de fibrillas de colágeno. Se puede realizar elevando el pH o ajustando la concentración de sal de una solución o suspensión de colágeno. Al formar el colágeno fibrilado, el colágeno puede incubarse para formar las fibrillas durante un período de tiempo apropiado, incluyendo entre 1 minuto y 24 horas, y todos los valores intermedios.

20 El colágeno fibrilado descrito en el presente documento generalmente puede formarse en cualquier forma y/o grosor apropiados, incluyendo láminas planas, láminas/formas curvas, cilindros, hilos y formas complejas. Estas láminas y otras formas pueden tener prácticamente cualquier dimensión lineal, incluido un grosor, anchura o altura mayor de 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70,80, 90 mm; 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 50, 100, 200, 500, 1.000, 1.500, 2.000 cm o más.

25 El colágeno fibrilado en un cuero biofabricado carece de cualquier cantidad sustancial de estructura de orden superior, tal como se define en las reivindicaciones. De acuerdo con la invención, las fibrillas de colágeno en un cuero biofabricado se desagregarán y no formarán las fibras de colágeno grandes que se encuentran en la piel animal y proporcionarán una estructura no anisotrópica fuerte y uniforme al cuero biofabricado.

30 De acuerdo con la invención, algunas fibrillas de colágeno pueden agruparse o alinearse en estructuras de orden superior. Las fibrillas de colágeno en un cuero biofabricado pueden exhibir un índice de orientación que varía de 0, > 0, 0,1, 0,2, 0,3, 0,4, 0,5, 0,6, 0,7, 0,8, 0,9, < 1,0 o 1,0, en las que un índice de orientación de 0 describe fibrillas de colágeno que carecen de alineación con otras fibrillas y un índice de orientación de 1,0 describe fibrillas de colágeno que están completamente alineadas. Este intervalo incluye todos los valores intermedios y subintervalos. Los expertos en la materia están familiarizados con el índice de orientación, por ejemplo, como se describe en Sizeland, et al., J. Agric. Food Chem. 61: 887-892 (2013) o Basil-Jones, et al., J. Agric. Food Chem. 59: 9972-9979(2011).  
35

Los procedimientos desvelados en el presente documento hacen posible producir un cuero biofabricado que comprende fibrillas de colágeno que difieren en diámetro de las producidas por un animal que expresa el mismo tipo de colágeno. Las características de los colágenos naturales, tales como el diámetro de la fibrilla y el grado de reticulación entre las fibrillas se ven afectados por factores genéticos y ambientales, tales como la especie o la raza del animal y por la condición del animal, por ejemplo, la cantidad de grasa, el tipo de alimento (por ejemplo, grano, hierba) y el nivel de ejercicio.  
40

Un cuero biofabricado puede ser fibrilado y procesado para que contenga fibrillas de colágeno que se asemejan o imitan a las propiedades de las fibrillas de colágeno producidas por especies o razas particulares de animales o por animales criados en condiciones particulares.  
45

Como alternativa, las condiciones de fibrilación y procesamiento pueden seleccionarse de modo que proporcionen fibrillas de colágeno distintas de las que se encuentran en la naturaleza, tal como disminuyendo o aumentando el diámetro de la fibrilla, el grado de alineación o el grado de reticulación en comparación con las fibrillas en cuero natural.  
50

Una red reticulada de colágeno, a veces llamado hidrogel, puede formarse a medida que el colágeno se fibrila o puede formar una red después de la fibrilación; en algunas variaciones, el proceso de fibrilación del colágeno también forma una red similar a un gel. Una vez formada, la red de colágeno fibrilado puede estabilizarse aún más incorporando moléculas con reactivos difuncionales, trifuncionales o multifuncionales que incluyen cromo, aminos, ácidos carboxílicos, sulfatos, sulfitos, sulfonatos, aldehídos, hidracidas, sulfhidrilos, diazarinas, aril-, azidas, acrilatos, epóxidos o fenoles.  
55

La red de colágeno fibrilado también se puede polimerizar con otros agentes (por ejemplo, polímeros que son capaces de polimerizar u otras fibras adecuadas), que podría usarse para estabilizar aún más la matriz y proporcionar la estructura final deseada. Los hidrogeles a base de acrilamidas, los ácidos acrílicos y sus sales pueden prepararse usando polimerización en suspensión inversa. Los hidrogeles descritos en el presente documento pueden prepararse a partir de monómeros polares. Los hidrogeles utilizados pueden ser hidrogeles de polímeros naturales, hidrogeles de polímeros sintéticos o una combinación de los dos. Los hidrogeles utilizados pueden obtenerse usando polimerización por injerto, polimerización de reticulación, redes formadas de polímeros solubles en agua, reticulación por radiación, y así sucesivamente. Se puede añadir una pequeña cantidad de agente de reticulación a la composición de hidrogel  
60  
65

para mejorar la polimerización.

La longitud promedio o individual de la fibrilla de colágeno puede variar de 100, 200, 300, 400, 500, 600, 700, 800, 900, 1.000 (1  $\mu\text{m}$ ); 5, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 200, 300, 400, 500, 600, 700, 800, 900, 1.000  $\mu\text{m}$  (1 mm) en todo el grosor de un cuero biofabricado. Estos intervalos incluyen todos los valores intermedios y subintervalos.

Las fibrillas pueden alinearse con otras fibrillas de más de 50, 100, 200, 300, 400, 500  $\mu\text{m}$  o más de sus longitudes o pueden exhibir poca o ninguna alineación. En otras realizaciones, algunas fibrillas de colágeno pueden agruparse o alinearse en estructuras de orden superior.

Las fibrillas de colágeno en un cuero biofabricado pueden exhibir un índice de orientación que varía de 0, > 0, 0,1, 0,2, 0,3, 0,4, 0,5, 0,6, 0,7, 0,8, 0,9, < 1,0 o 1,0, en las que un índice de orientación de 0 describe fibrillas de colágeno que carecen de alineación con otras fibrillas y un índice de orientación de 1,0 describe fibrillas de colágeno que están completamente alineadas. Este intervalo incluye todos los valores intermedios y subintervalos. Los expertos en la materia están familiarizados con el índice de orientación, por ejemplo, como se describe en Sizeland, et al., J. Agric. Food Chem. 61: 887-892 (2013) o Basil-Jones, et al., J. Agric. Food Chem. 59: 9972-9979(2011).

La densidad de fibrillas de colágeno de un cuero biofabricado puede variar de aproximadamente 1 a 1.000 mg/cc, preferentemente de 5 a 500 mg/cc, incluyendo todos los valores intermedios, tal como 5, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 150, 200, 250, 300, 350, 400, 450, 500, 600, 700, 800, 900 y 1.000 mg/cc.

Las fibrillas de colágeno en un cuero biofabricado pueden exhibir una distribución unimodal, bimodal, trimodal o multimodal, por ejemplo, un cuero biofabricado puede estar compuesto por dos preparaciones de fibrillas diferentes, cada una con un intervalo diferente de diámetros de fibrillas dispuestas alrededor de uno de dos modos diferentes. Dichas mezclas pueden seleccionarse para impartir propiedades aditivas, sinérgicas o un equilibrio de propiedades físicas en un cuero biofabricado conferido por fibrillas que tienen diferentes diámetros.

Los productos de cuero natural pueden contener 150-300 mg/cc de colágeno en función del peso del producto de cuero. Un cuero biofabricado puede contener un contenido similar de colágeno o fibrillas de colágeno como el cuero convencional basado en el peso del cuero biofabricado, tal como una concentración de colágeno de 100, 150, 200, 250, 300 o 350 mg/cc.

El colágeno fibrilado, a veces llamado hidrogel, puede tener un grosor seleccionado en función de su uso final. Las preparaciones más gruesas o más concentradas del colágeno fibrilado generalmente producen cueros biofabricados más gruesos. El grosor final de un cuero biofabricado puede ser solo del 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80 o 90 % del de la preparación de fibrillas antes de la contracción causada por la reticulación, deshidratación y lubricación.

**"Reticulación"** se refiere a la formación (o reformación) de enlaces químicos entre moléculas de colágeno. Una reacción de reticulación estabiliza la estructura del colágeno y, en algunos casos, forma una red entre las moléculas de colágeno. Se puede usar cualquier agente de reticulación adecuado conocido en la técnica, incluyendo, sin limitación, sales minerales, tales como las basadas en cromo, formaldehído, hexametileno diisocianato, glutaraldehído, compuestos de poliepoxi, irradiación gamma e irradiación ultravioleta con riboflavina. La reticulación se puede realizar por cualquier procedimiento conocido; véase, por ejemplo, Bailey et al., Radiat. Res. 22:606-621 (1964); Housley et al., Biochem. Biophys. Res. Commun. 67:824-830 (1975); Siegel, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 71:4826-4830 (1974); Mechanic et al., Biochem. Biophys. Res. Commun. 45:644-653 (1971); Mechanic et al., Biochem. Biophys. Res. Commun. 41:1597-1604 (1970); y Shoshan et al., Biochim. Biophys. Acta 154:261-263 (1968).

Los reticuladores incluyen isocianatos, carbodiimida, poli(aldehído), poli(aziridina), sales minerales, poli(epoxis), enzimas, tiirano, fenólicos, novolac, resole, así como otros compuestos que tienen químicas que reaccionan con cadenas laterales de aminoácidos, tales como lisina, arginina, ácido aspártico, ácido glutámico, hidroxilprolina o hidroxilisina.

Un colágeno o una proteína similar al colágeno puede modificarse químicamente para estimular la reticulación química y/o física entre las fibrillas de colágeno. La reticulación química puede ser posible porque los grupos reactivos, tales como lisina, ácido glutámico y los grupos hidroxilo en la molécula de colágeno se proyectan a partir de la estructura de fibrillas en forma de barra del colágeno. La reticulación que afecta a estos grupos evita que las moléculas de colágeno se deslicen unas sobre otras bajo tensión y, por lo tanto, aumenta la resistencia mecánica de las fibras de colágeno. Los ejemplos de reacciones de reticulación química incluyen, pero sin limitaciones, reacciones con el grupo  $\epsilon$ -amino de la lisina, o reacción con grupos carboxilo de la molécula de colágeno. Las enzimas, tales como la transglutaminasa, también se pueden usar para generar reticulaciones entre ácido glutámico y lisina para formar una reticulación estable de  $\gamma$ -glutamil-lisina. La inducción de la reticulación entre grupos funcionales de moléculas de colágeno vecinas se conoce en la técnica. La reticulación es otra etapa que puede implementarse en el presente documento para ajustar las propiedades físicas obtenidas de los materiales derivados de hidrogel de colágeno fibrilado.

El colágeno aún fibrilante o fibrilado puede ser reticulado o lubricado. Las fibrillas de colágeno se pueden tratar con

compuestos que contienen cromo o al menos un grupo aldehído, o taninos vegetales antes de la formación de la red, durante la formación de la red, o la formación de gel en la red. La reticulación estabiliza aún más el cuero de colágeno fibrilado. Por ejemplo, las fibrillas de colágeno pretratadas con polímero acrílico seguido de tratamiento con un tanino vegetal, tal como *Acacia Mollissima*, pueden exhibir una mayor estabilidad hidrotérmica. En otras realizaciones, el gliceraldehído se puede utilizar como agente de reticulación para aumentar la estabilidad térmica, la resistencia proteolítica y las características mecánicas, tal como el módulo de Young y el esfuerzo de tracción, del colágeno fibrilado.

Un material biofabricado que contiene una red de fibrillas de colágeno puede contener 0, > 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15, 20 % o más de un agente de reticulación, incluidos los agentes de curtido utilizados para el cuero convencional. Los agentes de reticulación pueden estar unidos covalentemente a las fibrillas de colágeno u otros componentes de un material biofabricado o estar asociados no covalentemente a ellos. Preferentemente, un cuero biofabricado contendrá no más de 1,2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10 % de un agente de reticulación.

**"Lubricación"** describe un proceso de aplicación de un lubricante, tal como una grasa u otro compuesto hidrófobo o cualquier material que module o controle la unión fibrilla-fibrilla durante la deshidratación al cuero o a productos biofabricados que comprenden colágeno. Una característica deseable de la estética del cuero es la rigidez o el tacto del material. Para lograr esta propiedad, la unión de hidrógeno mediada por agua entre fibrillas y/o fibras está limitada en el cuero mediante el uso de lubricantes. Los ejemplos de lubricantes incluyen grasas, aceites biológicos, minerales o sintéticos, aceite de bacalao, aceite sulfonado, polímeros, siloxanos organofuncionales y otros compuestos o agentes hidrófobos utilizados para engrasar el cuero convencional, así como sus mezclas. Si bien la lubricación es análoga de algún modo al engrase de un cuero natural, un producto biofabricado puede tratarse de manera más uniforme con un lubricante debido a su procedimiento de fabricación, composición más homogénea y composición menos compleja.

Otros lubricantes incluyen tensioactivos, tensioactivos aniónicos, tensioactivos catiónicos, tensioactivos poliméricos catiónicos, tensioactivos poliméricos aniónicos, polímeros anfifílicos, ácidos grasos, ácidos grasos modificados, polímeros hidrofílicos no iónicos, polímeros hidrofóbicos no iónicos, ácidos poliacrílicos, polimetacrílico, acrílicos, cauchos naturales, cauchos sintéticos, resinas, polímeros y copolímeros aniónicos anfifílicos, polímeros y copolímeros catiónicos anfifílicos y mezclas de los mismos, así como emulsiones o suspensiones de estos en agua, alcohol, cetonas y otros disolventes.

Se pueden añadir lubricantes a un material biofabricado que contiene fibrillas de colágeno. Se pueden incorporar lubricantes en cualquier cantidad que facilite el movimiento de la fibrilla o que confiera propiedades similares al cuero, tal como flexibilidad, disminución de la fragilidad, durabilidad o resistencia al agua. Un contenido de lubricante puede variar de aproximadamente 0.1, 0.25, 0.5, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55 y 60 % en peso del cuero biofabricado.

**"Deshidratación"** o **"desecación"** describe un proceso de eliminación de agua de una mezcla que contiene fibrillas de colágeno y agua, tal como una solución acuosa, suspensión, gel o hidrogel que contiene colágeno fibrilado. El agua puede eliminarse por filtración, evaporación, criodesecación, intercambio de disolvente, secado al vacío, secado por convección, calentamiento, irradiación o microondas, o por otros procedimientos conocidos para eliminar agua. Además, se sabe que la reticulación química del colágeno elimina el agua unida del colágeno al consumir restos de aminoácidos hidrofílicos, tales como lisina, arginina e hidroxilisina entre otros. Los inventores han descubierto que la acetona deshidrata rápidamente las fibrillas de colágeno y también puede eliminar el agua unida a las moléculas de colágeno hidratadas. El contenido de agua de un material biofabricado o cuero después de la deshidratación es, preferentemente, no superior al 60 % en peso, por ejemplo, no más del 5, 10, 15, 20, 30, 35, 40, 50 o 60 % en peso del cuero biofabricado. Este intervalo incluye todos los valores intermedios. El contenido de agua se mide por equilibrio a una humedad relativa del 65 % a 25 °C y 1 atmósfera.

La **"textura de grano"** describe una textura similar al cuero que es estética o texturalmente similar a la textura de un cuero de grano completo, cuero de grano superior, cuero de grano corregido (donde se ha aplicado un grano artificial), o textura de cuero de grano dividido más grueso. Ventajosamente, el material biofabricado de la invención puede ajustarse para proporcionar un grano fino, que se asemeja al grano superficial de un cuero como el representado en la figura 2A, 2B y 2C.

Un **"producto de cuero biofabricado"** incluye productos que comprenden al menos un componente de un cuero biofabricado, tal como calzado, prendas de ropa, guantes, tapicería de muebles o vehículos y otros artículos y productos de cuero. Incluye, aunque sin limitaciones, ropa, tales como sobretodos, abrigos, chaquetas, camisetas, pantalones, pantalones cortos, trajes de baño, ropa interior, uniformes, emblemas o letras, disfraces, corbatas, faldas, vestidos, blusas, mallas, guantes, mitones, calzado, zapatos, componentes del zapato, tal como suela, cuarto, lengüeta, pulsera, cerco y talón, zapatos de vestir, zapatos de deporte, zapatos para correr, zapatos informales, componentes de calzado deportivo, para correr o informal, tales como palas, puntera, suela exterior, entresuela, superior, cordones, ojetes, collar, forro, indentación de Aquiles, talón y contrafuerte, zapatos de moda o de mujer y sus componentes de calzado, tal como la parte superior, suela exterior, repunta, puntera, decoración, empeine, forro, calcetín, plantilla, plataforma, contrafuerte y tacón o tacón alto, botas, sandalias, botones, sandalias,

sombreros, máscaras, gorros, diademas, turbantes y cinturones; joyas, tales como pulseras, correas de reloj y collares; guantes, paraguas, bastones, carteras, fundas para teléfono móvil u ordenador portátil, bolsos, mochilas, maletas, bolsos de mano, folios, carpetas, cajas y otros objetos personales; equipos para atletismo, deporte, caza u ocio, tales como arneses, bridas, riendas, bocados, correas, mitones, raquetas de tenis, palos de golf, equipos para polo, hockey o lacrosse, tableros de ajedrez y tableros de juegos, balones medicinales, pelotas, pelotas de béisbol y otros tipos de pelotas y juguetes; encuadernaciones de libros, sobrecubiertas de libros, marcos de cuadros u obras de arte; muebles y mobiliario de hogar, oficina u otro de interior o exterior, incluidas sillas, sofás, puertas, asientos, otomanas, separadores de ambientes, posavasos, alfombrillas para ratón, secadores de escritorio u otras almohadillas, mesas, camas, suelo, recubrimientos de paredes o techos, solado; productos para automóviles, barcos, aeronaves y otros vehículos, incluidos asientos, reposacabezas, tapicerías, paneles, volantes, palancas de cambios o cubiertas de control y otras envolturas o cubiertas.

Muchos usos de productos cuero requieren un producto duradero que no se rasgue ni desgarre, incluso cuando el cuero se ha sido cosido. Los productos típicos que incluyen cuero cosido y requieren cuero duradero incluyen cubiertas de volante de automóviles, asientos de automóviles, muebles, artículos deportivos, zapatillas de deporte, zapatillas, correas de reloj y similares. Existe la necesidad de aumentar la durabilidad del cuero biofabricado para mejorar el rendimiento de estos productos. Se puede usar un cuero biofabricado de acuerdo con la invención para fabricar cualquiera de estos productos.

Las **propiedades físicas** de una red biofabricada de fibrillas de colágeno o un cuero biofabricado pueden seleccionarse o ajustarse seleccionando el tipo de colágeno, la cantidad de concentración de colágeno fibrilado, el grado de fibrilación, reticulación, deshidratación y lubricación.

Muchas propiedades ventajosas están asociadas con la estructura de red de las fibrillas de colágeno que pueden proporcionar propiedades fuertes, flexibles y sustancialmente uniformes al material o cuero biofabricado resultante. Las propiedades físicas preferentes del cuero biofabricado de acuerdo con la invención incluyen una resistencia a la tracción que varía de 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15 o más MPa, una flexibilidad determinada por el alargamiento a la rotura que varía de 1, 5, 10, 15, 20, 25, 30 % o más, una blandura determinada por la norma ISO 17235 de 4, 5, 6, 7, 8 mm o más, un grosor que varía entre 0,2, 0,3, 0,4, 0,5, 0,6, 0,7, 0,8, 0,9, 1,0, 1,1, 1,2, 1,3, 1,4, 1,5, 1,6, 1,7, 1,8, 1,9, 2,0 mm o más, y una densidad de colágeno (densidad de fibrillas de colágeno) de 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 200, 300, 400, 500, 600, 700, 800, 900, 1.000 mg/cc o más, preferentemente, 100-500 mg/cc. Los intervalos anteriores incluyen todos los subintervalos y valores intermedios.

**Grosor.** Dependiendo de su aplicación final, un material o cuero biofabricado puede tener cualquier grosor. Su grosor varía preferentemente de aproximadamente 0,05 mm a 20 mm, así como cualquier valor intermedio dentro de este intervalo, tal como 0,05, 0,1, 0,2, 0,5, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 25, 30, 40, 50 mm o más. El grosor de un cuero biofabricado se puede controlar ajustando el contenido de colágeno.

**Módulo elástico.** El módulo elástico (también conocido como módulo de Young) es un número que mide la resistencia de un objeto o sustancia a deformarse elásticamente (es decir, de forma no permanente) cuando se le aplica una fuerza. El módulo elástico de un objeto se define como la pendiente de su curva de esfuerzo-deformación en la región de deformación elástica. Un material más rígido tendrá un módulo elástico más alto. El módulo elástico se puede medir usando un analizador de textura.

Un cuero biofabricado puede tener un módulo elástico de al menos 100 kPa. Puede variar de 100 kPa a 1.000 MPa, así como cualquier valor intermedio en este intervalo, tal como 0,1, 0,2, 0,3, 0,4, 0,5, 0,6, 0,7, 0,8, 0,9, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 50, 100, 200, 300, 400, 500, 600, 700, 800, 900 o 1.000 MPa. Un cuero biofabricado puede alargarse hasta un 300% de su longitud en estado relajado, por ejemplo, por > 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 150, 200, 250 o 300 % de su longitud de estado relajado.

La **resistencia a la tracción** (también conocida como resistencia a la tracción máxima) es la capacidad de un material o estructura para soportar cargas que tienden a alargarse, a diferencia de la resistencia a la compresión, que soporta cargas que tienden a reducir el tamaño. La resistencia a la tracción resiste la tensión o la separación, mientras que la resistencia a la compresión resiste la compresión o el empuje de acercamiento.

Una muestra de un material biofabricado puede analizarse para determinar la resistencia a la tracción utilizando una máquina Instron. Las pinzas se unen a los extremos de la muestra y se estira de la muestra en direcciones opuestas hasta que falla. Se demuestra una buena resistencia cuando la muestra tiene una resistencia a la tracción de al menos 1 MPa. Un cuero biofabricado puede tener una resistencia a la tracción de al menos 1 kPa. Puede variar de 1 kPa a 100 MPa, así como cualquier valor intermedio en este intervalo, tales como 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 50, 100, 200, 300, 400, 500 kPa; 0,5, 0,6, 0,7, 0,8, 0,9, 1,0, 1,1, 1,2, 1,3, 1,4, 1,5, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90 o 100 MPa.

La **resistencia al desgarro** (también conocida como resistencia al desgarro) es una medida cuánto puede un material soportar los efectos del desgarro. Más específicamente, sin embargo, es cuánto puede un material (normalmente caucho) resistir el crecimiento de cualquier corte cuando está bajo tensión, generalmente se mide en kN/m. La

resistencia al desgarro se puede medir mediante el procedimiento ASTM D 412 (el mismo que se usa para medir la resistencia a la tracción, el módulo y el alargamiento). ASTM D 624 se puede usar para medir la resistencia a la formación de un desgarro (inicio del desgarro) y la resistencia a la expansión de un desgarro (propagación del desgarro). Independientemente de cuál de estos dos se esté midiendo, la muestra se mantiene entre dos soportes y se aplica una fuerza de tracción uniforme hasta que se produce la deformación mencionada anteriormente. La resistencia al desgarro se calcula dividiendo la fuerza aplicada por el grosor del material. Un cuero biofabricado puede exhibir resistencia al desgarro de al menos 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 100, 150 o 200 % más que la de un cuero de grano superior convencional u otro cuero del mismo grosor que comprenda el mismo tipo de colágeno, por ejemplo, colágeno bovino de tipo I o de tipo III, procesado utilizando los mismos reticuladores o lubricantes. Un material biofabricado puede tener una resistencia al desgarro que varía de aproximadamente 1 a 500 N, por ejemplo, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 125, 150, 175, 200, 225, 250, 275, 300, 325, 350, 375, 400, 425, 450, 475 o 500, así como cualquier resistencia a la rotura intermedia dentro de este intervalo.

**Blandura.** La norma ISO 17235 2015 especifica un procedimiento no destructivo para determinar la blandura del cuero. Es aplicable a todos los cueros no rígidos, por ejemplo, el cuero de la parte superior del zapato, cuero para tapicería, artículos de cuero, cuero y prendas de vestir de cuero. Un cuero biofabricado puede tener una blandura determinada por la norma ISO 17235 de 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 10, 11, 12 mm o más.

**Grano.** La superficie de grano superior del cuero a menudo se considera la más deseable debido a su textura suave y superficie lisa. El grano superior es una red altamente porosa de fibrillas de colágeno. La fuerza y la resistencia al desgarro del grano a menudo es una limitación para aplicaciones prácticas del grano superior solo y los productos de cuero convencionales a menudo están forrados con corium que tiene un grano mucho más grueso. Las figuras 2A, 2B y 2C comparan las superficies de cuero de grano superior y de corium. Se puede usar un material biofabricado como se desvela en el presente documento que puede producirse con propiedades físicas fuertes y uniformes o con un grosor aumentado para proporcionar productos similares a granos superiores sin el requisito del forro de corium.

**Contenido de otros componentes.** En algunas realizaciones, el colágeno está libre de otros componentes de cuero, tales como elastina o proteínas animales no estructurales. Sin embargo, en algunas realizaciones, el contenido de actina, queratina, elastina, fibrina, albúmina, globulina, mucina, mucinoides, proteínas estructurales no colagenosas y/o proteínas no estructurales no colagenosas en un cuero biofabricado pueden variar de 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 a 10 % en peso del cuero biofabricado. En otras realizaciones, un contenido de actina, queratina, elastina, fibrina, albúmina, globulina, mucina, mucinoides, proteínas estructurales no colagenosas y/o proteínas no estructurales no colagenosas pueden incorporarse en un cuero biofabricado en cantidades que van desde > 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20 % o más en peso de un cuero biofabricado. Dichos componentes pueden introducirse durante o después de la fibrilación, reticulación, deshidratación o lubricación.

Un **"tinte de cuero"** se refiere a tintes que pueden usarse para colorear cuero o cuero biofabricado. Estos incluyen tintes ácidos, tintes directos, lacas, tintes de azufre, tintes básicos y tintes reactivos. Los tintes y pigmentos también se pueden incorporar en un precursor de un cuero biofabricado, tal como en una suspensión o gel de red que comprende fibrillas de colágeno durante la producción del cuero biofabricado.

**"Cargas".** En algunas realizaciones, un cuero biofabricado puede comprender cargas, que no sean componentes de cuero, tales como microesferas. Una forma de controlar la organización de la red de fibrillas deshidratadas es incluir materiales de carga que mantengan las fibrillas separadas durante la deshidratación. Estos materiales de relleno incluyen nanopartículas, micropartículas, o varios polímeros, tales como syntan, de uso común en la industria del curtido. Estos materiales de carga podrían ser parte del material de cuero deshidratado final, o los materiales de carga podrían ser de sacrificio, es decir, se degradan o disuelven dejando espacio abierto para una red de fibrillas más porosa. La forma y dimensión de estas cargas también se pueden usar para controlar la orientación de la red de fibrillas deshidratadas.

En algunas realizaciones, una carga puede comprender microesfera(s) poliméricas, cuenta(s), fibra(s), alambre(s) o sal(es) orgánica(s). Otros materiales también pueden incrustarse o incorporarse de otro modo en un cuero biofabricado o en una red de fibrillas de colágeno según la invención. Estas incluyen, pero sin limitación, fibras, incluyendo fibras tejidas y no tejidas, así como algodón, lana, cachemira, angora, lino, bambú, líber, cáñamo, soja, Seacell, fibras producidas a partir de leche o proteínas lácteas, seda, seda de araña, otros péptidos o polipéptidos, incluidos péptidos o polipéptidos producidos de forma recombinante, quitosano, micelio, celulosa, incluyendo celulosa bacteriana, madera, incluidas Fibras de madera, rayón, Lyocell, viscosa, hilo antimicrobiano (A.M.Y.), Sorbtek, nylon, poliéster, elastómeros, tales como Lycra®, spandex o elastano y otros copolímeros de poliéster-poliuretano, aramidas, carbono, incluidas las fibras de carbono y los fulerenos, vidrio, incluidas fibras de vidrio y no tejidos, silicio y compuestos que contienen silicio, minerales, incluidas partículas minerales y fibras minerales, y metales o aleaciones metálicas, incluidos las que comprenden hierro, acero, plomo, oro, plata, platino, cobre, cinc y titanio, que pueden estar en forma de partículas, fibras, alambres u otras formas adecuadas para incorporar en cuero biofabricado. Tales cargas pueden incluir un material eléctricamente conductor, material magnético, material fluorescente, material bioluminiscente, material fosforescente u otro material fotoluminiscente, o combinaciones de los mismos. Las mezclas o combinaciones de estos componentes también se pueden incrustar o incorporar en un cuero biofabricado, por ejemplo, para modificar las propiedades químicas y físicas desveladas en el presente documento.

**Procedimiento de fabricación.** Un procedimiento para formar cuero biofabricado a partir de colágeno incluye las etapas de fibrilación, reticulación, deshidratación/desección y lubricación en cualquier orden. Por ejemplo, una solución de colágeno puede ser fibrilada, las fibrillas pueden reticularse con un agente, tal como glutaraldehído, luego se reviste con un lubricante, tal como un aceite sulfitado, y luego se deshidrata por filtración para formar un cuero de colágeno fibrilado. Sin embargo, el procedimiento de elaboración no se limita a este orden particular de etapas.

Como alternativa, después de la reticulación de fibrillas, las fibrillas se pueden deshidratar mediante un intercambio de disolvente con acetona, seguido de engrasado con un aceite sulfitado antes de evaporar el disolvente para formar un cuero de colágeno fibrilado. Además, la incorporación de reticulaciones químicas o físicas entre fibrillas (para impartir resistencia al material) se puede lograr en cualquier momento durante el proceso. Por ejemplo, un colágeno fibrilado sólido, a veces llamado hidrogel, pueden formarse, entonces esta red de fibrillas puede deshidratarse a través de un intercambio de disolventes con acetona, seguido de engrasado con un aceite sulfitado. Además, las fibrillas de colágeno pueden reticularse en una red a través de la incorporación de otros polímeros como los que se usan normalmente en formulaciones de resina.

Materiales tales como lubricantes, humectantes, tintes y otros agentes de tratamiento se pueden distribuir uniformemente a través de un producto de cuero biofabricado durante el proceso de biofabricación. Esta es una ventaja en comparación con el curtido y el engrasado de cuero convencional que, debido a su heterogeneidad estructural, a menudo hace imposible un tratamiento uniforme. Además, dado que se pueden incorporar agentes químicos antes de la formación de la red, serían necesarias cantidades más pequeñas de sustancias químicas de tratamiento, ya que hay una pérdida química reducida al no tener que penetrar en una red de colágeno desde un flotador que contiene las sustancias químicas de tratamiento. A diferencia de las altas temperaturas que a menudo se usan para tratar el cuero natural, un biofabricado se puede calentar a temperatura ambiente o a una temperatura no superior a 37 °C durante el procesamiento antes de evaporar el disolvente para formar un cuero de colágeno fibrilado. Como alternativa, las fibrillas de colágeno pueden reticularse y lubricarse en suspensión antes de formar una red entre las fibrillas durante la deshidratación o mediante la adición de un agente aglutinante a la suspensión o al material deshidratado.

Un procedimiento para formar un material de cuero biofabricado puede incluir inducir fibrilación de colágeno en una solución; reticulación (por ejemplo, curtido) y deshidratación del colágeno fibrilado, que puede aparecer en forma de hidrogel, para obtener una lámina de colágeno fibrilada u otro producto e incorporar al menos un humectante o lubricante, tal como una grasa o aceite en la lámina o producto de colágeno fibrilado para obtener un cuero biofabricado flexible.

Un procedimiento para biofabricar un cuero a partir de fibrillas puede incluir inducir la fibrilación de colágeno o proteínas similares al colágeno en una solución para obtener un hidrogel de colágeno fibrilado; reticular el hidrogel de colágeno fibrilado para obtener un cuero de hidrogel de colágeno fibrilado; e incorporar al menos un aceite lubricante en el cuero de hidrogel de colágeno fibrilado.

En los procesos descritos en el presente documento para producir un cuero biofabricado, el orden de las etapas para formar cuero biofabricado puede variar o pueden realizarse dos o más etapas simultáneamente. Por ejemplo, la fibrilación y la reticulación pueden realizarse juntas o mediante la adición de uno o más agentes, o pueden incorporarse reticulante y lubricante en la solución antes de fibrilar el colágeno, etc.

El colágeno o las proteínas similares al colágeno se pueden obtener mediante la extracción de colágeno de una fuente animal, tales como, pero sin limitación, la extracción de pellejo bovino o colágeno tendinoso. Como alternativa, el colágeno o las proteínas similares al colágeno pueden obtenerse de una fuente no animal, por ejemplo a través de técnicas de ADN recombinante, técnicas de cultivo celular o síntesis química de péptidos.

Cualquiera de estos procedimientos puede incluir la polimerización del colágeno o proteínas similares al colágeno en dímeros, trímeros y oligómeros de orden superior antes de la fibrilación, y/o modificar químicamente el colágeno o las proteínas similares al colágeno para promover la reticulación entre el colágeno o las proteínas similares al colágeno.

Cualquiera de estos procedimientos puede incluir funcionalizar el colágeno o las proteínas similares al colágeno con una o una combinación de cromo, amina, ácido carboxílico, sulfato, sulfito, sulfonato, aldehído, hidrazida, sulfhidrilo, diazirina, arilo, azida, acrilato, epóxido o grupo fenol.

La inducción de la fibrilación puede incluir añadir una sal o una combinación de sales, por ejemplo, la sal o combinación de sales puede incluir:  $\text{Na}_3\text{PO}_4$ ,  $\text{K}_3\text{PO}_4$ ,  $\text{KCl}$  y  $\text{NaCl}$ , la concentración de sal de cada sal puede estar entre 10 mM y 5M, etc.

Generalmente, la inducción de la fibrilación puede comprender ajustar el pH con un ácido o una base, añadir un agente nucleante, tal como un microgel de colágeno ramificado, en el que el agente nucleante tiene una concentración entre 1 mM y 100 mM.

El colágeno fibrilado puede estabilizarse con un compuesto de cromo, un compuesto aldehído, o taninos vegetales, o

cualquier otro agente de reticulación. Por ejemplo, el colágeno fibrilado puede estabilizarse con un compuesto de cromo, un compuesto aldehído o taninos vegetales, en el que el cromo, aldehído, o compuestos de tanino vegetal tienen una concentración de entre 1 mM a 100 mM.

5 Cualquiera de estos procedimientos puede incluir ajustar el contenido de agua del colágeno fibrilado a 5, 10, 20, 25, 30, 40, 50 o 60 % o menos en peso para obtener el cuero de hidrogel de colágeno fibrilado. Por ejemplo, el material de colágeno fibrilado puede estar deshidratado. Cualquiera de estos procedimientos también puede incluir teñir y/o aplicar un acabado superficial al cuero de colágeno fibrilado.

10 La selección de materiales de partida de colágeno para biofabricar los materiales de cuero diseñados por ingeniería descritos en el presente documento puede controlarse, el producto resultante puede formarse diferencialmente con propiedades físicas y estéticas para distintos usos finales, tales como con características útiles en calzado y diferentes características útiles en prendas de ropa. Generalmente, los cueros derivados de hidrogel de colágeno fibrilado biofabricados descritos en el presente documento se forman a partir de soluciones de colágeno que son inducidas para autoensamblarse en fibrillas de colágeno.

15 Las fibrillas de colágeno, a diferencia de las fibrillas de colágeno endógeno, no se ensamblan en ninguna estructura de orden superior (por ejemplo, haces de fibras), pero permanecen algo desordenadas, más particularmente fibrillas desagregadas. Cuando se ensamblan *in vivo*, las fibrillas de colágeno generalmente se alinean lateralmente para formar haces que tienen un mayor orden de estructura y forman fibras de colágeno duras de tamaño de micrómetros, por ejemplo, en la piel. Un rasgo característico de las fibrillas de colágeno nativas es su estructura en bandas. El diámetro de la fibrilla nativa cambia ligeramente a lo largo de la longitud, con una repetición de banda D altamente reproducible de aproximadamente 67 nm. En algunas realizaciones de los procedimientos descritos en el presente documento, las fibrillas de colágeno pueden no estar en bandas y no estar en haces o pueden estar en bandas y desagregadas o pueden tener una banda D de espaciado diferente que varía de 1 a 100 nm y todos los valores intermedios en este intervalo). Las fibrillas de colágeno pueden estar orientadas aleatoriamente (por ejemplo, no orientadas o no orientadas en ninguna dirección o eje en particular).

20 El material de partida utilizado para formar el material de cuero biofabricado como se describe en el presente documento puede incluir cualquier fuente de colágeno no humana apropiada o colágenos modificados o diseñados por ingeniería que puedan fibrilarse.

25 Varias formas de colágeno se encuentran en todo el reino animal. El colágeno utilizado en el presente documento puede obtenerse de fuentes animales, incluyendo tanto vertebrados como invertebrados, o de fuentes sintéticas. El colágeno también puede provenir de subproductos del procesamiento animal existente. El colágeno obtenido de fuentes animales puede aislarse utilizando técnicas de laboratorio estándar conocidas en la técnica, por ejemplo, Silva et. Al., Marine Origin Collagens and its Potential Applications, Mar. Drugs, 2014 Dec., 12(12); 5881-5901).

30 Uno de los principales beneficios de los materiales de cuero biofabricados y los procedimientos para formarlos descritos en el presente documento es que el colágeno se puede obtener de fuentes que no requieren la muerte de un animal.

35 El colágeno descrito en el presente documento también puede obtenerse mediante técnicas de cultivo celular que incluyen células cultivadas en un biorreactor.

40 El colágeno también se puede obtener mediante técnicas de ADN recombinante. Las construcciones que codifican colágeno no humano pueden introducirse en organismos hospedadores para producir colágeno no humano. Por ejemplo, el colágeno también se puede producir con levadura, tal como *Hansenulapolyomorpha*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Pichia pastoris* y similares, como huéspedes. Además, en los últimos años, se han identificado genomas bacterianos que proporcionan la secuencia de aminoácidos repetitiva (Gly-Xaa-Yaa)<sub>n</sub> característica que es característica del colágeno de triple hélice. Por ejemplo, la bacteria grampositiva *Streptococcus pyogenes* contiene dos proteínas similares al colágeno, Scl1 y Scl2 que ahora tienen una estructura y propiedades funcionales bien caracterizadas. Por tanto, sería posible obtener construcciones en sistemas de *E. coli* recombinantes con varias modificaciones de secuencia de Scl1 o Scl2 para establecer procedimientos de producción a gran escala. El colágeno también se puede obtener a través de técnicas estándar de síntesis de péptidos. El colágeno obtenido de cualquiera de las técnicas mencionadas puede polimerizarse adicionalmente. Los dímeros y trímeros de colágeno se forman a partir de la autoasociación de monómeros de colágeno en solución.

45 Como etapa inicial en la formación de los materiales de colágeno descritos en el presente documento, el material de colágeno de partida puede colocarse en solución y fibrilarse. La fibrilación de colágeno puede inducirse mediante la introducción de sales a la solución de colágeno. La adición de una sal o una combinación de sales, tales como fosfato de sodio, fosfato potásico, cloruro de potasio y cloruro de sodio a la solución de colágeno pueden cambiar la fuerza iónica de la solución de colágeno. La fibrilación de colágeno puede producirse como resultado del aumento de las interacciones electrostáticas, a través de un mayor enlace de hidrógeno, interacciones de Van der Waals y enlaces covalentes. Las concentraciones de sal adecuadas pueden variar, por ejemplo, desde aproximadamente 10 mM, 50 mM, 100 mM, 500 mM, 1M, 2M, 3M, 4M a 5M, así como cualquier valor intermedio dentro de este intervalo.

- La fibrilación de colágeno también puede inducirse o potenciarse con un agente nucleante distinto de las sales. Los agentes nucleantes proporcionan una superficie sobre la cual los monómeros de colágeno pueden entrar en contacto cercano entre sí para iniciar la fibrilación o pueden actuar como un punto de ramificación en el que se conectan múltiples fibrillas a través del agente nucleante. Los ejemplos de agentes nucleantes adecuados incluyen, pero sin limitación: microgeles que contienen colágeno, micropartículas o nanopartículas de colágeno, partículas metálicas o fibras derivadas de forma natural o sintética. Las concentraciones adecuadas de agente nucleante pueden variar de aproximadamente 1 mM a 100 mM.
- Una red de colágeno también puede ser muy sensible al pH. Durante la etapa de fibrilación, el pH se puede ajustar para controlar las dimensiones de la fibrilla, como el diámetro y la longitud. Las dimensiones generales y la organización de las fibrillas de colágeno afectarán a la tenacidad, la estirabilidad y la transpirabilidad de los materiales derivados de colágeno fibrilados resultantes. Esto puede ser útil para fabricar cuero derivado de colágeno fibrilado para diversos usos que pueden requerir diferente tenacidad, flexibilidad y transpirabilidad. El ajuste de pH, con o sin un cambio en la concentración de sal, puede usarse para la fibrilación.
- Una forma de controlar la organización de la red de fibrillas deshidratadas es incluir materiales de carga que mantengan las fibrillas separadas durante el secado. Estos materiales de carga podrían incluir nanopartículas, micropartículas, o varios polímeros, tales como syntan, de uso común en la industria del curtido. Estos materiales de carga podrían ser parte del material de cuero deshidratado final, o los materiales de carga podrían ser de sacrificio, es decir, se degradan o disuelven dejando espacio abierto para una red de fibrillas más porosa.
- El colágeno o las proteínas similares al colágeno pueden modificarse químicamente para estimular la reticulación química y física entre las fibrillas de colágeno. La reticulación química puede ser posible porque los grupos reactivos, tales como lisina, ácido glutámico y los grupos hidroxilo en la molécula de colágeno se proyectan a partir de la estructura de fibrillas en forma de barra del colágeno. La reticulación que afecta a estos grupos evita que las moléculas de colágeno se deslicen unas sobre otras bajo tensión y, por lo tanto, aumenta la resistencia mecánica de las fibras de colágeno. Los ejemplos de reacciones de reticulación química incluyen, pero sin limitaciones, reacciones con el grupo  $\epsilon$ -amino de la lisina, o reacción con grupos carboxilo de la molécula de colágeno. Las enzimas, tales como la transglutaminasa, también se pueden usar para generar reticulaciones entre ácido glutámico y lisina para formar una reticulación estable de  $\gamma$ -glutamil-lisina. La inducción de la reticulación entre grupos funcionales de moléculas de colágeno vecinas se conoce en la técnica. La reticulación es otra etapa que puede implementarse en el presente documento para ajustar las propiedades físicas obtenidas de los materiales derivados de hidrogel de colágeno fibrilado.
- Una vez formada, la red de colágeno fibrilado puede estabilizarse aún más incorporando moléculas con reactivos difuncionales, trifuncionales o multifuncionales que incluyen cromo, aminas, ácidos carboxílicos, sulfatos, sulfitos, sulfonatos, aldehídos, hidracidas, sulfhidrilos, diazarinas, aril-, azidas, acrilatos, epóxidos o fenoles.
- La red de colágeno fibrilado también se puede polimerizar con otros agentes (por ejemplo, polímeros que son capaces de polimerizar u otras fibras adecuadas) que forman un hidrogel o tienen cualidades fibrosas, que podría usarse para estabilizar aún más la matriz y proporcionar la estructura final deseada. Los hidrogeles a base de acrilamidas, los ácidos acrílicos y sus sales pueden prepararse usando polimerización en suspensión inversa. Los hidrogeles descritos en el presente documento pueden prepararse a partir de monómeros polares. Los hidrogeles utilizados pueden ser hidrogeles de polímeros naturales, hidrogeles de polímeros sintéticos o una combinación de los dos. Los hidrogeles utilizados pueden obtenerse usando polimerización por injerto, polimerización de reticulación, redes formadas de polímeros solubles en agua, reticulación por radiación, y así sucesivamente. Se puede añadir una pequeña cantidad de agente de reticulación a la composición de hidrogel para mejorar la polimerización.
- Se puede preparar cualquier grosor apropiado del hidrogel de colágeno fibrilado como se describe en el presente documento. Debido a que el grosor final será mucho menor (por ejemplo, entre 10-90 % más delgado) que el grosor del hidrogel, el grosor inicial del hidrogel puede depender del grosor del producto final deseado, suponiendo los cambios en el grosor (o volumen total), incluida la contracción durante la reticulación, la deshidratación y/o la adición de uno o más aceites u otros lubricantes como se describe en el presente documento.
- Un grosor de hidrogel puede estar entre 0,1 mm y 50 cm o cualquier valor intermedio dentro de este intervalo. Al formar el hidrogel fibrilado, el hidrogel puede incubarse para formar el grosor durante un período de tiempo apropiado, incluyendo entre 1 min y 24 horas.
- Los hidrogeles de colágeno fibrilado descritos en el presente documento generalmente pueden conformarse en cualquier forma y/o grosor apropiados, incluyendo láminas planas, láminas/formas curvas, cilindros, hilos y formas complejas. Además, prácticamente cualquier tamaño lineal de estas formas. Por ejemplo, cualquiera de estos hidrogeles se puede conformar en una lámina que tiene un grosor como se ha descrito y una longitud mayor de 10 mm (por ejemplo, mayor que, en cm, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95, 100, 200, 300, 400, 500, 600, 700, 800, 900, 1000, 1100, 1200, 1500, etc.) y una anchura mayor que 10 mm, tal como mayor que, en cm, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95, 100, 200, 300, 400, 500, 600, 700, 800, 900, 1000,

1100, 1200, 1500, etc.

Una vez que las fibrillas de colágeno, a menudo caracterizadas como un hidrogel, se han formado o durante la formación, pueden estar reticuladas. Por ejemplo, el hidrogel de colágeno fibrilado se trata con compuestos que contienen cromo o al menos un grupo aldehído, o taninos vegetales antes de la formación del gel, durante la formación del gel o después de la formación del gel, para estabilizar aún más el hidrogel de colágeno fibrilado. Por ejemplo, las fibrillas de colágeno pueden tratarse previamente con un polímero acrílico seguido de un tratamiento con un tanino vegetal (por ejemplo, *Acacia Mollissima*) pueden exhibir una mayor estabilidad hidrotérmica. En otros ejemplos, el gliceraldehído puede usarse como agente de reticulación que puede aumentar la estabilidad térmica, la resistencia proteolítica y las características mecánicas (por ejemplo, módulo de Young, esfuerzo de tensión) del hidrogel de colágeno fibrilado.

La fibrilación de una solución de colágeno tal como se describe en el presente documento (por ejemplo, la formación de fibrillas de colágeno que carecen de un mayor orden de organización tal como haces) se puede rastrear de manera visual. Por ejemplo, a medida que se induce la fibrilación, la solución transparente de colágeno, que tiene poca absorbancia a 400 nm, se vuelve opaca y tiene una absorbancia de aproximadamente 0,5 a 400 nm. Dependiendo de la temperatura y el volumen del material de partida, la fibrilación y la formación de hidrogel pueden ocurrir algo rápidamente después de la inducción y completarse en gran medida después de una hora y media, como lo muestran los valores de absorbancia que se nivelan después de que pasen 70 minutos. Puede producirse un aumento en el módulo de almacenamiento (o cualidades viscoelásticas del material) del hidrogel de colágeno fibrilado después de la inducción de aproximadamente 1 Pa (para la solución de colágeno) a aproximadamente 400 Pa para el hidrogel de colágeno fibrilado.

Como se ha mencionado anteriormente y se ilustra en las Figuras 1 y 2, la piel de animal normalmente incluye fibrillas que se ordenan en estructuras de orden superior, incluyendo la presencia de bandas (que tienen regiones lacunares regulares) y la formación de múltiples fibrillas en fibras alineadas que luego pueden agruparse en haces de colágeno. En cambio, los hidrogeles de colágeno y, por lo tanto, los cueros biofabricados descritos en el presente documento pueden tener una estructura de fibrillas de colágeno desorganizada primaria en todo el grosor (en algunos casos, el volumen completo) del material. Específicamente, la estructura de colágeno de los cueros biofabricados formados a partir de hidrogeles de colágeno puede estar principalmente desagregada y desorientada a lo largo de cualquier eje particular. En algunas variaciones, las fibrillas de colágeno pueden no estar en bandas (por ejemplo, más del 10 % sin bandas, mayor de 20 %, 30 %, 40 %, 50 %, 60 %, 70 %, 80 %, 90 %, etc. sin bandas en todo el volumen). Asimismo, la orientación de las fibrillas de colágeno dentro del volumen (o en todo el volumen) puede estar no orientada u orientada al azar, y esta falta de orientación puede ser la misma en todo el volumen, en lugar de cambiar el grosor del volumen como en el cuero nativo, que pueden cambiar de haces de fibrillas de colágeno que están orientados verticalmente a haces que están orientados horizontalmente en el grosor. Cualquiera de las propiedades que son iguales en cualquier nivel de grosor del hidrogel y, por lo tanto, el material de cuero resultante puede denominarse en el presente documento "uniformemente" igual en todo el grosor.

Además, cualquiera de los cueros biofabricados descritos en el presente documento puede tener una distribución uniforme de las fibrillas en todo el grosor del gel y, por lo tanto, el material de cuero resultante. Esto contrasta con los cueros nativos, tal como el material mostrado en la figura 2, que muestra un aumento en el número de haces de fibras a través del grosor del material.

La falta de una organización de nivel superior de los hidrogeles de colágeno fibrilado y el material de cuero formado a partir de ellos es evidente en las figuras 3A y 3B. La figura 3A muestra una micrografía electrónica de barrido de un hidrogel de colágeno fibrilado formado como se describe en el presente documento. De forma similar, la figura 4 muestra una micrografía electrónica de transmisión a través de un hidrogel de colágeno fibrilado. La micrografía electrónica de transmisión y la micrografía electrónica de barrido muestran que el hidrogel de colágeno fibrilado es una maraña desordenada de fibrillas de colágeno. Como se ha mencionado anteriormente, la densidad y, en cierta medida, el patrón de formación de fibrillas de colágeno puede controlarse ajustando el pH de la solución de colágeno durante la inducción de fibrilación junto con la concentración de fibrillas durante la deshidratación. La figura 3 también muestra una micrografía electrónica de barrido de corium bovino. En comparación con un corium bovino natural (figura 3B), la red de colágeno fibrilado es mucho más aleatoria y carece de estrías aparentes. Aunque el tamaño total de las fibrillas puede ser similar, la disposición de estas fibrillas es bastante diferente. Estas diferencias ultraestructurales entre las fibrillas de colágeno dentro del hidrogel de colágeno fibrilado y el tejido natural como el corium bovino (y el cuero resultante hecho de ellas) pueden no ser un problema en el producto final de cuero biofabricado, pueden ser tan blandos o más blandos, y más flexibles que el cuero natural y pueden tener una apariencia similar.

El colágeno fibrilado, a veces llamado hidrogel, puede deshidratarse después para eliminar el hidrogel de colágeno fibrilado de la mayor parte de su contenido de agua. Eliminar el agua del hidrogel de colágeno fibrilado puede cambiar su calidad física de un gel hidratado a una lámina flexible. El material puede tratarse para evitar roturas/desgarros. Por ejemplo, se debe tener cuidado de no eliminar demasiada agua del colágeno fibrilado. En algunos ejemplos, puede ser deseable deshidratar el colágeno fibrilado para que tenga un contenido de agua inferior al 5, 10, 15, 20, 25, 30, 40, 50 o 60 %. El contenido de agua se determina por equilibrio a 25 °C a 1 atmósfera de presión a una humedad relativa del 65 %.

La deshidratación puede implicar secado al aire, filtración de vacío y presión, intercambio de disolventes o similares. Por ejemplo, el hidrogel de colágeno fibrilado también puede sufrir deshidratación mediante el reemplazo de su contenido de agua con disolventes orgánicos. Los disolventes orgánicos adecuados pueden incluir, pero sin limitaciones, acetona, etanol, éter dietílico, y así sucesivamente. Posteriormente, los disolventes orgánicos pueden evaporarse (por ejemplo, secado al aire, secado al vacío, etc.). También es posible realizar etapas sucesivas de deshidratación usando uno o más de un disolvente orgánico para ajustar el nivel de deshidratación en el producto final.

Después o durante la deshidratación, el material de colágeno fibrilado puede tratarse con lubricantes y/o aceites para impartir mayor flexibilidad y flexibilidad al material de colágeno fibrilado. El uso de una combinación de aceite y disolvente puede permitir que el aceite penetre mejor en la red de colágeno fibrilado en comparación con el uso de aceite por sí mismo. Es probable que el aceite solo penetre en las superficies expuestas, pero puede que no se infiltre fácilmente en todo el grosor del material de colágeno fibrilado en un período de tiempo razonable. Una vez que la composición de aceite/disolvente ha penetrado en todo el grosor del material, el disolvente puede eliminarse. En algunas realizaciones, el material de fibrillas de colágeno resultante presenta un aspecto más de tipo cuero en comparación con el material de fibrillas de colágeno antes del tratamiento con lubricante y/o aceite. Los aceites y lubricantes adecuados pueden incluir, pero sin limitación, aceite de ricino, aceite de pino, lanolina, aceite de visón, aceite de pata de vaca, aceite de pescado, manteca de karité, aloe, y demás.

La lubricación de la red de colágeno fibrilado deshidratado y reticulado o hidrogel para formar un material de cuero puede dar como resultado un material que tenga propiedades similares o mejores, que las propiedades del cuero natural. Las soluciones que incluían una combinación de aceites y disolventes orgánicos aumentaron la masa y la blandura (inversamente proporcional a la pendiente de la curva de tensión-deformación) del material de colágeno fibrilado deshidratado. Esto se debe a la combinación de aceites y disolventes orgánicos que penetran en el material de colágeno fibrilado deshidratado y una vez que penetran, los aceites permanecieron distribuidos por todo el material, mientras que los disolventes orgánicos pueden evaporarse. Aunque no se muestra, el uso de aceites por sí solo puede no ser tan efectivo para penetrar completamente a través del material de colágeno fibrilado deshidratado.

Los materiales de colágeno fibrilados resultantes pueden tratarse de manera similar al cuero natural derivado de piel o pellejo de animal, y recurtirse, teñirse y/o acabarse. Las etapas de procesamiento adicionales pueden incluir: reticulación, recurtido y recubrimiento de superficie. La reticulación y el recurtido pueden incluir subprocesos, tales como humectación (rehidratación del cuero semiprocesado), escurrido (el 45-55 % de agua se exprime del cuero), división (el cuero se divide en una o más capas), afeitado (el cuero se adelgaza), neutralización (el pH del cuero se ajusta entre 4,5 y 6,5), teñido (el cuero se colorea), engrasado (grasas, aceites, ceras se fijan a las fibras de cuero), carga (sustancias químicas densos/pesadas para hacer el cuero más duro y pesado), relleno (grasas, aceites, ceras añadidas entre las fibras de cuero), fijación (las sustancias químicas no unidas se unen/atrapan y eliminan), fraguado (se imparte aplanamiento del grano y se elimina el exceso de agua), secado (el cuero se seca a los niveles de humedad deseados, 10-25 %), acondicionamiento (se añade humedad al cuero a un nivel de 18-28 %), ablandamiento (ablandamiento físico del cuero separando las fibras), o pulido (abrasión de la superficie del cuero para reducir defectos de la pelusa y el grano). El recubrimiento de superficie puede incluir una cualquiera o una combinación de las siguientes etapas: engrase (cuero recubierto con aceite o aceites crudos), abrillantado, pulverización, recubrimiento con rodillos, recubrimiento por cortina, pulido, recubrimiento, gofrado, planchado o abrillantado.

A diferencia de los pellejos de animales, donde el pellejo tiene que recortarse para obtener el grosor o las dimensiones deseadas, el material de cuero diseñado por ingeniería puede fabricarse con una amplia gama de grosores y las dimensiones deseadas teniendo en cuenta un producto final en particular.

La producción de tales materiales de cuero diseñados por ingeniería también puede generar menos desperdicios al evitar la etapa de eliminar el exceso de proteínas, grasas y pelo necesarios para tratar el cuero natural de los animales en el proceso de producción de cuero, lo que da como resultado un menor impacto ambiental del proceso desvelado y los productos derivados de estos procedimientos.

## REALIZACIONES DE LA INVENCIÓN

La invención es tal como se define en las reivindicaciones.

La invención incluye, pero sin limitaciones, materiales biofabricados que tienen las características que se describen a continuación.

La invención se dirige a un material

(i) que comprende una red de fibrillas de colágeno no humano, en el que menos del 5 o 10 % en peso de las fibrillas de colágeno en el material están en forma de fibras de colágeno que tienen un diámetro de 5, 6, 7, 8, 9 o 10  $\mu\text{m}$  o más, y/o están en forma de fibrillas alineadas para 100  $\mu\text{m}$  o más de sus longitudes; en el que las fibrillas de colágeno no se ensamblan en haces de fibras; en el que dicho material no contiene más del 10, 20, 30 o 40 o 50

o el 60 % en peso de agua; en el que dicho material contiene al menos el 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 20, 30, 40 % en peso de un lubricante; y en el que opcionalmente el material comprende una superficie superior e inferior o una superficie interna y externa; o

(ii) que comprende una red de fibrillas de colágeno no humano recombinante, en el que el colágeno contiene hidroxilisina; en el que dicho material no contiene más del 5, 10, 15, 20 o el en peso de agua; en el que el material contiene al menos 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 20, 30 o 40 % de un lubricante; y en el que, opcionalmente, el material comprende una superficie superior e inferior o una superficie interna y externa. El contenido de lubricante se puede seleccionar para que coincida o no exceda la capacidad de absorción del material biofabricado para un lubricante. Tal material puede comprender colágeno de mamífero, tal como colágeno bovino de tipo I o de tipo III. Preferentemente no contendrá pelo, folículo(s) piloso(s) o grasa(s) de un animal que expresa de forma natural las moléculas de colágeno que contiene. Por ejemplo, puede contener menos de 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10 % en peso de actina, queratina, elastina, fibrina, albúmina, globulina, mucina, mucinoides, proteínas estructurales no colagenosas y/o proteínas no estructurales no colagenosas encontradas en cuero convencional. Puede estar sustancialmente libre de otras proteínas colagenosas, hidratos de carbono, ácidos nucleicos, lípidos o inmunógenos, alérgenos o alérgenos encontrados en un cuero convencional, tal como un animal que expresa de forma natural las moléculas de colágeno en un material biofabricado. Las realizaciones alternativas de la divulgación pueden incorporar 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10 % de uno o más de actina, queratina, elastina, fibrina, albúmina, globulina, mucina, mucinoides, proteínas estructurales no colagenosas y/o proteínas no estructurales no colagenosas encontradas en cuero convencional.

El colágeno utilizado para producir las fibrillas en este material puede aislarse de una fuente natural, preferentemente en forma purificada, o puede producirse de forma recombinante o producirse por síntesis química. Generalmente contiene 4-hidroxiprolina. Puede ser diferente en estructura química del colágeno obtenido de una fuente natural, por ejemplo, puede contener un contenido inferior de, o sustancialmente nada, hidroxilisina o 3-hidroxiprolina, restos de aminoácidos glicosilados o reticulados, u otras modificaciones postraduccionales de una secuencia de aminoácidos de colágeno. Como alternativa, puede contener un mayor contenido de restos de aminoácidos hidroxilados, restos glicosilados, reticulaciones u otras modificaciones químicas.

El material descrito anteriormente generalmente comprende una red de fibrillas de colágeno que pueden exhibir una densidad de fibrillas de entre 5, 10, 20, 50, 100, 200, 300, 400, 500, 600, 700, 800, 900 y 1.000 mg/cc, preferentemente entre 100 y 500 mg/cc. Estas fibrillas o red de fibrillas pueden conferir una textura de grano, tal como una textura de grano superior, tacto o estética en un material biofabricado o cuero biofabricado. Sin embargo, un material biofabricado puede exhibir una porosidad y otras propiedades físicas que son más uniformes que un cuero convencional correspondiente que puede controlarse o ajustarse mediante el control de la composición, tamaño de la fibrilla, reticulación y lubricación en un producto biofabricado.

En muchas realizaciones, el material biofabricado descrito anteriormente tendrá una superficie superior e inferior, o una superficie interna y externa, que comprende las fibrillas de colágeno. Una o más de estas superficies pueden estar expuestas externamente. Una sola capa de material biofabricado puede exhibir grano y apariencia sustancialmente idénticos en ambos lados, a diferencia de los productos de cuero convencionales donde los diámetros de la fibrilla o fibra de colágeno aumentan para obtener más capas internas de un pellejo.

En otras realizaciones, un material biofabricado puede fundirse, moldearse o configurarse de otra manera en una forma particular que puede exhibir propiedades sustancialmente uniformes sobre su(s) superficie(s).

Las fibrillas de colágeno en un material biofabricado pueden ajustarse para tener un diámetro particular. La distribución de los diámetros de fibrilla puede exhibir una distribución sustancialmente unimodal, una distribución bimodal, una distribución trimodal u otras distribuciones multimodales. Las distribuciones multimodales pueden estar compuestas de dos o más preparaciones diferentes de fibrillas producidas usando diferentes condiciones de fibrilación. En una distribución sustancialmente unimodal > 50, 60, 70, 80, 90, 95 o 99 % de los diámetros de las fibrillas se distribuyen alrededor de un solo modo. En distribuciones bimodales, al menos 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45 o 50 % de las fibrillas se distribuirán alrededor de un modo. En distribuciones trimodales y otras distribuciones multimodales, en general, al menos aproximadamente 5, 10, 15, 20, 25, 30 % o más (dependiendo del número de modos) de los diámetros de fibrilla se distribuirán alrededor de un modo.

Un material biofabricado puede contener fibrillas en las que al menos 50, 60, 70, 80, 90, 95 o 99 % de las fibrillas de colágeno tienen diámetros entre 1 nm y 1  $\mu$ m. Los diámetros de fibrillas pueden determinarse por procedimientos conocidos en la técnica, incluida la inspección visual de micrografías o micrografías electrónicas, tal como micrografías electrónicas de barrido o de transmisión. Por ejemplo, las fibrillas de colágeno pueden tener un diámetro de fibrilla promedio colectivo o individual que varía de 1, 2, 3, 4, 5, 10, 15, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 200, 300, 400, 500, 600, 700, 800, 900 o 1.000 nm (1  $\mu$ m).

Las fibrillas de colágeno en el material biofabricado descrito anteriormente generalmente se reticulan por contacto con al menos un agente que forma reticulaciones entre las fibrillas de colágeno. Tal reticulante puede seleccionarse de una o más de una amina, ácido carboxílico, sulfato, sulfito, sulfonato, aldehído, hidrazida, sulfhidrido, diazirina, arilo, azida, acrilato, epóxido, fenol, compuesto de cromo, taninos vegetales y syntan.

- 5 La reticulación puede realizarse a una concentración de reticulante que varía de 1, 5, 10, 25, 50, 75 a 100 mM y puede realizarse en condiciones que expongan uniformemente las fibrillas de colágeno al reticulante de modo que el número promedio de reticulaciones formadas sea uniforme y varíe en no más del 5, 10, 15, 20, 25, 30, 40, 45 o 50 % en volúmenes unitarios idénticos del material.
- 10 Un material biofabricado puede contener al menos 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10 % de un agente de reticulación basado en el peso del material o en el peso del colágeno o colágeno fibrillas en el material. El reticulante puede estar presente en forma covalente o no covalente, por ejemplo, puede estar unido covalentemente a las fibrillas de colágeno. Un reticulante puede estar presente de manera uniforme en el material biofabricado donde su concentración en peso (o en moles) varía en no más de 5, 10, 15, 20, 25, 30, 40, 45 o 50 % en volúmenes unitarios idénticos del material.
- 15 El material biofabricado o cuero biofabricado descrito anteriormente contiene un lubricante. Se pueden producir materiales no lubricados que contengan una red de fibrillas de colágeno, tales sustratos precursores para lubricación posterior, pero pueden carecer de las propiedades flexibles y otras propiedades útiles de un producto lubricado. Se pueden incorporar lubricantes en cualquier cantidad que facilite el movimiento de la fibrilla o que confiera propiedades similares al cuero, tal como flexibilidad, disminución de la fragilidad, durabilidad, la fuerza, aumento de la resistencia a la fractura o el desgarrar, o resistencia al agua. Un contenido de lubricante puede variar de aproximadamente 0.1, 0.25, 0.5, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55 y 60 % en peso del cuero biofabricado.
- 20 Los lubricantes utilizados en realizaciones de la invención incluyen, pero sin limitaciones, grasas, aceites biológicos, minerales o sintéticos, aceite de bacalao, aceite sulfonado, polímeros, resinas, siloxanos organofuncionales y otros agentes utilizados para engrasar el cuero convencional; mezclas de los mismos. Otros lubricantes incluyen tensioactivos, tensioactivos aniónicos, tensioactivos catiónicos, tensioactivos poliméricos catiónicos, tensioactivos poliméricos aniónicos, polímeros anfífilicos, ácidos grasos, ácidos grasos modificados, polímeros hidrofílicos no iónicos, polímeros hidrofóbicos no iónicos, ácidos poliacrílicos, polimetacrílico, acrílicos, cauchos naturales, cauchos sintéticos, resinas, polímeros y copolímeros aniónicos anfífilicos, polímeros y copolímeros catiónicos anfífilicos y mezclas de los mismos, así como emulsiones o suspensiones de estos en agua, alcohol, cetonas y otros disolventes.
- 25 Las soluciones o emulsiones que contienen un lubricante pueden emplearse como lubricantes, por ejemplo, resinas y otros lubricantes hidrofóbicos se pueden aplicar como emulsiones o en disolventes adecuados para disolverlos. Dichas soluciones pueden contener cualquier cantidad de lubricante adecuado para su aplicación o incorporación en un cuero biofabricado. Por ejemplo, pueden contener 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 70, 80, 90, 95 o 99 % de un lubricante o el mismo, o una cantidad correspondiente al volumen de otros ingredientes, tal como al menos un disolvente acuoso, tal como agua, alcoholes, tales como alcoholes C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>, como etanol, cetonas, tales como cetonas C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>, aldehídos, tales como aldehídos C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>, ceras, tensioactivos, dispersantes u otros agentes. Los lubricantes pueden estar en varias formas, tales como emulsiones de Ac/A o A/Ac, en soluciones acuosas o hidrófobas, en forma pulverizable u otras formas adecuadas para su incorporación o aplicación a un material biofabricado.
- 30 Los lubricantes se pueden distribuir uniformemente a través de un material biofabricado, de modo que la concentración del lubricante en volúmenes unitarios idénticos del material varíe no más del 5, 10, 15, 20, 35, 30, 40 o 50 % y puede ser compuesto o mezclado en formas adecuadas para una aplicación uniforme a o en un material biofabricado.
- 35 Algunas realizaciones de un producto biofabricado exhibe muchas propiedades ventajosas similares al cuero o propiedades nuevas o superiores en comparación con el cuero convencional.
- 40 En otras realizaciones, un cuero biofabricado puede tener un módulo elástico de al menos 100 kPa. Puede variar de 100 kPa a 1.000 MPa así como cualquier valor intermedio en este intervalo, tal como 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 50, 100, 1.000 kPa, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90 o 100 MPa. Puede variar de 100 kPa a 1.000 MPa, así como cualquier valor intermedio en este intervalo, tal como 0,1, 0,2, 0,3, 0,4, 0,5, 0,6, 0,7, 0,8, 0,9, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 50, 100, 200, 300, 400, 500, 600, 700, 800, 900 o 1.000 MPa.
- 45 Algunas realizaciones exhibirán una elasticidad uniforme, en el que el módulo elástico varía en no más de 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45 o 50 % cuando se mide en ángulos que difieren en 30, 60 o 90 grados (u otros ángulos) a través de longitudes o anchuras idénticas (o volúmenes o áreas de sección transversal fija) del material.
- 50 Algunas realizaciones pueden estirarse y alargarse 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15, 20, 25, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 150, 200, 250 a 300 % de su longitud en un estado relajado. Este intervalo incluye todos los valores intermedios.
- 55 En algunas realizaciones, un cuero biofabricado puede tener una resistencia a la tracción de al menos 1 kPa. Puede variar de 1 kPa a 100 MPa, así como cualquier valor intermedio en este intervalo, tales como 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 50, 100, 200, 300, 400, 500 kPa; 0,5, 0,6, 0,7, 0,8, 0,9, 1,0, 1,1, 1,2, 1,3, 1,4, 1,5, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90 o 100 MPa. Algunas realizaciones exhibirán una resistencia a la tracción uniforme, en el que la resistencia a la tracción varía en no más de 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45 o 50 % cuando se mide en ángulos que difieren en 30, 60 o 90 grados (u otros ángulos) a través de longitudes o anchos idénticos (o volúmenes o áreas de sección transversal fija) del material.
- 60
- 65

Algunos cueros presentan resistencia al desgarro o resistencia de al menos 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 100, 150 o 200 % más que la de un cuero convencional u otro cuero del mismo grosor que comprende el mismo tipo de colágeno, por ejemplo, colágeno bovino de tipo I o de tipo III, procesado utilizando los mismos reticuladores o lubricantes. Algunas realizaciones exhibirán una resistencia al desgarro uniforme que varía en no más de 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45 o 50 % cuando se mide en ángulos que difieren en 30, 60 o 90 grados (o en otros ángulos) a través de longitudes o anchos idénticos (o volúmenes o áreas de sección transversal fija) del material. Un material biofabricado puede tener una resistencia al desgarro que varía de aproximadamente 1 a 500 N, por ejemplo, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 125, 150, 175, 200, 225, 250, 275, 300, 325, 350, 375, 400, 425, 450, 475 o 500, así como cualquier resistencia a la rotura intermedia dentro de este intervalo.

Un cuero biofabricado, o un compuesto que lo contiene, puede tener una blandura determinada por la norma ISO 17235 de 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 10, 11, 12 mm o más. Algunas realizaciones exhibirán una blandura uniforme que varía en no más de 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50 o 100 % cuando se mide en áreas unitarias o volúmenes idénticos del material biofabricado.

En otras realizaciones, un material biofabricado exhibe un grosor personalizado para proporcionar productos similares de grano superior sin el requisito de forro de corium. En algunas realizaciones, el material tendrá una superficie superior e inferior o una superficie interna y externa que tienen un grano, textura de grano, tacto y apariencia sustancialmente iguales o idénticas. Otras realizaciones están estampados con un patrón, envejecido o impreso, coloreado o pintado. Otras realizaciones tienen un recubrimiento o acabado superficial, que se puede distribuir uniformemente sobre el material o en todo el mismo de manera que su concentración en peso en volúmenes unitarios idénticos o sobre áreas unitarias del material varíe no más de 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, o 50 %. Algunas realizaciones pueden contener un tinte, colorante, resina, polímero, pigmento o pintura, opcionalmente, en el que el tinte, colorante, resina, polímero, pigmento o pintura se distribuyen uniformemente en todo el material, de modo que su concentración en peso en volúmenes unitarios idénticos o en áreas unitarias del material varía en no más de 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45 o 50 %.

Ciertas realizaciones del material biofabricado descrito anteriormente pueden contener cargas, así como otras sustancias o componentes incorporados en la red de fibrillas de colágeno. Por ejemplo, algunas realizaciones contendrán una carga, tal como al menos una de microesfera(s) polimérica(s), cuenta(s), fibra(s), alambre(s) o sal(es) orgánica(s). Estos pueden seleccionarse para controlar la organización de la red de fibrillas de colágeno deshidratado manteniendo las fibrillas separadas durante el secado. Una carga puede ser soluble en algunas condiciones o de otra manera en una forma que permita su eliminación de un material biofabricado después del secado u otro procesamiento.

Otras realizaciones incluyen al menos un material tejido o no tejido incorporado en la red de fibrillas de colágeno o una red de fibras de colágeno incorporadas en el material no tejido o tejido.

En algunas realizaciones, el material biofabricado se incorporará a otros productos, tal como calzado., prendas de ropa, ropa de deporte, uniformes, carteras, correas de reloj, pulseras, equipaje, tapicería o muebles.

#### **REALIZACIONES DEL PROCEDIMIENTO DE FABRICACIÓN**

La invención es tal como se define en las reivindicaciones.

El procedimiento de acuerdo con la divulgación incluye, pero sin limitación, las siguientes realizaciones.

Un procedimiento para fabricar:

- (i) un material que comprende una red de fibrillas de colágeno no humano, en el que menos del 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15, 20, 25, 30, 35 o el 40 % en peso de las fibrillas de colágeno en el material están en forma de fibras de colágeno que tienen un diámetro de 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10  $\mu\text{m}$  o más y/o están en forma de fibrillas alineadas para 25, 50, 100, 150, 200, 250, 300, 350 o 400  $\mu\text{m}$  o más de sus longitudes; en el que dicho material contiene no más del 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55 o el 60 % en peso de agua; y en el que dicho material contiene al menos 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 20, 30 o 40 % de un lubricante, que comprende, en cualquier orden: fibrilar una solución o suspensión acuosa de moléculas de colágeno no humano en fibrillas de colágeno, reticular dichas fibrillas de colágeno poniéndolas en contacto con al menos un agente reticulante, deshidratar las fibrillas de colágeno reticuladas para que contengan menos del 40 % en peso de agua, incorporar al menos 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 20, 30 o 40 % en peso de al menos un lubricante en dicho material, y, opcionalmente, colada, moldear, o de otro modo formar, dicho material que comprende una superficie superior e inferior o una superficie interna y externa; o
- (ii) un material que comprende una red de fibrillas de colágeno no humano recombinante, en el que el colágeno no contiene 3-hidroxiprolina y, opcionalmente, sustancialmente no contiene hidroxilisina; en el que dicho material contiene no más de 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55 o 60 % en peso de agua; y en el que dicho material contiene al menos 1 % de un lubricante que comprende en cualquier orden: fibrilar una solución o suspensión

acuosa de moléculas de colágeno no humano en fibrillas de colágeno, reticular dichas fibrillas de colágeno poniéndolas en contacto con al menos un agente reticulante, deshidratar las fibrillas de colágeno reticuladas para que no contengan más del 5, 10, 15, 20 o 25 % en peso de agua e incorporar al menos 1, 2, 3, 4, 5, 10, 15, 20, 30, 40, o 50 % en peso de al menos un lubricante en dicho material, y, opcionalmente, colada, moldear, o de otro modo formar dicho material que comprende una superficie superior e inferior o una superficie interna y externa.

El colágeno o material colagenoso para su uso en este procedimiento puede comprender colágeno de mamífero, tal como de tipo I bovino, colágeno de tipo III u otros tipos y fuentes de colágenos o proteínas colagenosas descritas en el presente documento. Puede obtenerse de un mamífero u otro animal o, en algunas realizaciones, expresarse recombinantemente por *Escherichia coli*, *Bacillus subtilis*, u otra bacteria; por *Pichia*, *Saccharomyces* u otra levadura u hongo; por una célula vegetal; por una célula de insecto o por una célula de mamífero.

El colágeno para su uso en los procedimientos desvelados en el presente documento también puede aislarse de las células, tales como los descritos anteriormente, que se cultivan *in vitro*, tal como de células cultivadas de mamíferos o animales. Como alternativa, el colágeno o las proteínas colagenosas se pueden obtener por otros medios, tal como por síntesis química. Puede ser diferente en estructura química del colágeno obtenido de una fuente natural, por ejemplo, puede contener un contenido inferior de, o sustancialmente nada, hidroxilisina o 3-hidroxiprolina, restos de aminoácidos glicosilados o reticulados, u otras modificaciones postraduccionales de una secuencia de aminoácidos de colágeno. Como alternativa, puede contener un mayor contenido de restos de aminoácidos hidroxilados, restos glicosilados, reticulaciones u otras modificaciones químicas.

Preferentemente un colágeno no contendrá pelo, folículo(s) piloso(s) o grasa(s) de un animal que expresa naturalmente las moléculas de colágeno que contiene, ya que pueden restarle uniformidad, resistencia y propiedades estéticas. Por ejemplo, puede contener menos de 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10 % en peso de actina, queratina, elastina, fibrina, albúmina, globulina, mucina, mucinoides, proteínas estructurales no colagenosas y/o proteínas no estructurales no colagenosas encontradas en cuero convencional. Puede estar sustancialmente libre de otras proteínas colagenosas, hidratos de carbono, ácidos nucleicos, lípidos o inmunógenos, antígenos o alérgenos encontrados en un cuero convencional, tal como un animal que expresa de forma natural las moléculas de colágeno en un material biofabricado.

En algunas realizaciones, un colágeno o material similar al colágeno para su uso en los procedimientos descritos en el presente documento puede purificarse hasta una homogeneidad sustancial o puede tener un grado de pureza no inconsistente con su capacidad para formar fibrillas, por ejemplo, puede contener 25, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 95 o 99 % en peso de colágeno en función de su contenido total de proteínas o de su peso total. Pueden usarse mezclas de diferentes tipos de colágeno o colágenos de diferentes fuentes biológicas en ciertas realizaciones para equilibrar las propiedades químicas y físicas de las fibrillas de colágeno o para producir una mezcla de fibrillas que tienen propiedades complementarias. Dichas mezclas pueden contener 1, 5, 10, 25, 50, 75, 95 o 99 % en peso de un primer colágeno y 99, 95, 90, 75, 50, 25, 10 o 1% en peso de un segundo, tercero, o posterior componente de colágeno. Estos intervalos incluyen todos los valores intermedios y proporciones de colágenos donde el contenido total de colágeno de todos los componentes de colágeno en peso es del 100 %.

Los procedimientos desvelados en el presente documento pueden proporcionar un producto biofabricado que tiene fibrillas distribuidas de manera sustancialmente uniforme, fibrillas reticuladas, fibrillas deshidratadas y/o fibrillas lubricadas. Por ejemplo, las fibrillas se pueden distribuir por todo el material de modo que la concentración en peso (o por número o números promedio) de las fibrillas de colágeno en volúmenes unitarios idénticos del material varía en no más de 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45 o 50 %.

En algunas realizaciones, el material biofabricado apilará el material después de la reticulación, deshidratación y/o lubricación.

En las realizaciones descritas en el presente documento, una solución o suspensión de colágeno se fibrila, por ejemplo, ajustando una concentración de sal de la solución o suspensión, ajustando su pH, por ejemplo, elevar el pH de una solución ácida de colágeno, o ambos. En algunas realizaciones, la fibrilación puede facilitarse incluyendo un agente nucleante. Las sales utilizadas para la fibrilación incluyen, entre otras, sales de fosfato y sales de cloruro, tales como  $\text{Na}_3\text{PO}_4$ ,  $\text{K}_3\text{PO}_4$ ,  $\text{KCl}$  y  $\text{NaCl}$ . La concentración de sal durante la fibrilación puede ajustarse para variar de 10 mM a 2M, o el pH puede ajustarse a pH 5,5, 6,0, 6,5, 7,0, 8,0 o más con un ácido, una base o un tampón. La concentración de sal y el pH pueden ajustarse simultáneamente para inducir o promover la fibrilación. En ciertas realizaciones de los procedimientos descritos en el presente documento, una solución o suspensión acuosa de moléculas de colágeno que tiene un pH por debajo de pH 6,0 puede fibrilarse ajustando el pH a pH 6,0 a 8,0.

En algunas realizaciones de los procedimientos descritos en el presente documento, las fibrillas de colágeno se reticularán durante un proceso de su formación o después de la finalización de la fibrilación.

En algunas realizaciones, las fibrillas de colágeno se reticular poniéndolas en contacto con al menos una amina, ácido carboxílico, sulfato, sulfito, sulfonato, aldehído, hidrazida, sulfhidrilo, diazirina, arilo, azida, acrilato, epóxido, fenol, compuesto de cromo, taninos vegetales y syntan.

Se pueden añadir uno o más reticuladores a una concentración que varía de 1 mM a 100 mM, por ejemplo a una concentración de 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 6, 70, 75, 80,85, 90, 95 o 100 mM.

5 El tiempo, la temperatura y otras condiciones químicas y físicas de reticulación pueden seleccionarse para proporcionar un grado particular de reticulación entre las fibrillas de colágeno de modo que las fibrillas reticuladas resultantes contengan un grado particular de una o más reticulaciones diferentes. Una preparación de fibrilla reticulada resultante puede contener al menos 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 % o más de un agente de reticulación basado en el peso del agente de reticulación y el peso del colágeno o sobre el peso de una red reticulada de fibrillas de colágeno, tal como un hidrogel. El reticulante puede estar unido covalentemente o no covalentemente a las fibrillas de colágeno. El número de reticulaciones entre o entre moléculas de colágeno, tropocolágeno, o fibrillas en volúmenes unitarios idénticos del material después de la reticulación, o un número promedio de reticulaciones entre las moléculas de colágeno, tropocolágeno o fibrillas de colágeno, puede variar en no más del 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45 o 50 %.

10 Los procedimientos descritos en el presente documento requieren una etapa de deshidratación o desecado que puede ocurrir durante la fibrilación o la reticulación, o ambas, o después de que la fibrilación y la reticulación estén sustancialmente completas.

20 En algunas realizaciones, deshidratar implica poner en contacto una red de fibrillas de colágeno con acetona, syntan u otro agente que elimina el agua ligada del colágeno. En otras realizaciones, se puede eliminar algo de agua de una preparación de fibrillas o preparación de fibrillas reticuladas por filtración o evaporación, y el agua restante asociada con la red de fibrillas de colágeno se elimina luego usando un disolvente como acetona u otros agentes químicos que eliminan el agua.

25 Los procedimientos descritos en el presente documento generalmente requieren lubricación de la red de fibrillas de colágeno producidas. La lubricación puede tener lugar durante la fibrilación, reticulación, deshidratación, o durante cualquiera de estas etapas, o después de que uno o más de estas etapas se haya completado sustancialmente.

30 En algunas realizaciones, la lubricación implicará poner en contacto una red de fibrillas de colágeno reticuladas con uno o más lubricantes, tales como grasas, aceites biológicos, minerales o sintéticos, aceite de bacalao, aceite sulfonado, polímeros, siloxanos organofuncionales y otros agentes utilizados para engrasar el cuero convencional; o mezclas de los mismos.

35 En otras realizaciones, el o los lubricantes se aplicarán utilizando procedimientos que faciliten la lubricación uniforme de una red reticulada deshidratada de fibrillas de colágeno, de modo que la concentración del lubricante en peso en volúmenes unitarios idénticos del material varía en no más del 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45 o 50 %. Dicha aplicación puede producirse mediante recubrimiento por inmersión, recubrimiento por pulverización, deposición con vapor, recubrimiento por centrifugado, recubrimiento con rasqueta, recubrimiento con cepillo, así como otros procedimientos conocidos de recubrimiento o deposición.

40 En realizaciones adicionales de los procedimientos descritos en el presente documento, se aplica un recubrimiento superficial o acabado superficial a un material biofabricado. Si bien estos pueden aplicarse a una superficie de un material que comprende una red de fibrillas de colágeno durante las diversas etapas de la preparación de un material biofabricado, generalmente se aplicarán a un producto reticulado, deshidratado y lubricado. La lubricación uniforme hecha posible por los procedimientos descritos en el presente documento facilita la aplicación uniforme exitosa y la adherencia de tales recubrimientos o acabados.

45 En otras realizaciones, los procedimientos descritos en el presente documento pueden incluir la incorporación o contacto de un material biofabricado durante las diversas etapas de su preparación o después de que se haya reticulado, deshidratado y lubricado con otros ingredientes funcionales, que incluyen, pero sin limitación, un tinte, colorante, pigmento, resina, polímero o pintura. En realizaciones adicionales, estos ingredientes funcionales pueden aplicarse o incorporarse en condiciones que distribuyan uniformemente estos agentes sobre el material o por todo el mismo, de modo que su concentración en peso en volúmenes unitarios idénticos del material varíe no más de 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45 o 50 %.

50 En otras realizaciones, el procedimiento descrito en el presente documento implica incorporar una carga en un material biofabricado durante las diversas etapas de su preparación o después de que se haya reticulado, deshidratado y lubricado. De forma general, estas cargas se incorporan antes de la deshidratación, por ejemplo, durante la fibrilación o reticulación. Tales cargas incluyen, pero sin limitación, microsferas poliméricas, cuentas, fibras, alambres o sales orgánicas.

55 Algunas realizaciones de los procedimientos descritos anteriormente implicarán incorporar en o sobre un material biofabricado durante o después de su preparación al menos un material tejido o no tejido. Por ejemplo, filtrando las fibrillas reticuladas usando un material de tela o papel tejido o no tejido. Otras realizaciones implican incorporar un material biofabricado durante o después de su preparación en al menos un material tejido o no tejido.

Las realizaciones comerciales del procedimiento implican incorporar un material biofabricado en productos tales como calzado, prendas de ropa, ropa de deporte, uniformes, carteras, correas de reloj, pulseras, equipaje, tapicerías, muebles u otros productos industriales, comerciales o de consumo.

- 5 Los siguientes ejemplos no limitantes son ilustrativos de la presente invención. El alcance de la invención no se limita a los detalles descritos en estos ejemplos.

### Ejemplo 1

#### 10 Control del grosor del cuero biofabricado

Se formaron hidrogeles de colágeno bovino de tipo I extraído a diferentes concentraciones y volúmenes de colágeno para producir materiales de colágeno secos de diferentes grosores. El colágeno se disolvió en HCl 0,01 N a 5 g/l o 9 g/l, a continuación, se añadió 1 parte de 10x PBS a 9 partes de colágeno disuelto para inducir la fibrilación de colágeno y la formación de gel.

A continuación, se vertieron soluciones de 0,8 l o 1,6 l del colágeno fibrilante en moldes y se incubaron a 25 °C para permitir la formación de hidrogel. La solución de 0,8 l produjo un gel de 1,5 cm de grosor mientras que la solución de 1,7 l produjo un gel de 3,0 cm de grosor. Estos geles se deshidrataron y lubricaron en acetona, la continuación, se secaron y apilaron mecánicamente en un material similar a cuero. El grosor del material seco final se correlacionó con la cantidad total de colágeno en el hidrogel de partida.

El grosor del cuero biofabricado se controló variando su contenido total de colágeno. Las muestras A, B y C se produjeron con 4, 7,2 o 14,4 g de colágeno, respectivamente, en un volumen (área de gel hidratado) de 525 cm<sup>2</sup>. Se produjeron cueros biofabricados a partir de cada muestra mediante reticulación, lubricación y deshidratación. Como se muestra en la Tabla 1, el aumento del contenido de colágeno en los geles aumentó el grosor del cuero biofabricado resultante.

Tabla 1

Muestra	Densidad del gel (g/l)	Volumen del gel (l)	Grosor del gel (cm)	Colágeno total (g)	Grosor del cuero (mm)
A	5	0,8	1,5	4	0,1
B	9	0,8	1,5	7,2	0,2
C	9	1,6	3,0	14,4	1,1

### 30 Ejemplo 2

#### Producción de cuero biofabricado a partir de colágeno de tipo I

35 El colágeno de tipo I se adquirió de Wuxi Biot Bio-technology Company, Ltd. (Medical Collagen Sponge). El colágeno se aisló del tendón bovino mediante tratamiento con ácido, seguido de digestión con pepsina, y se purificó mediante cromatografía de exclusión por tamaño, se congeló y se liofilizó.

40 La proteína liofilizada (4,1 g) se disolvió en 733 ml de HCl 0,01 N usando un mezclador superior. Después de disolver adecuadamente el colágeno, como lo demuestra la falta de una esponja de colágeno sólido en la solución (al menos 1 hora de mezcla a 1.600 rpm), se añadieron 82 µl del agente de curtido Relugan GTW a la solución, seguido de 81 ml de un 10x PBS, a pH 11,2 para elevar el pH de la solución a 7,2.

45 A continuación, la solución se mezcló durante 3 minutos antes de verter la solución en un molde de silicio. La solución de colágeno se incubó en el molde de silicio durante 2 horas a 25 °C para permitir que el colágeno fibrilara en un hidrogel viscoelástico.

50 La meseta de propiedades reológicas junto con la opacidad de la solución (medida por la absorbancia de la luz de 425 nm) indicaron que la fibrilación se había completado en este punto y la presencia de fibrillas de colágeno se confirmó con microscopía electrónica de barrido (Figura 3) y microscopía electrónica de transmisión (Figura 4).

55 El hidrogel de colágeno fibrilado se retiró de los moldes y se colocó en 700 ml de acetona en un recipiente de plástico y se agitó en un agitador orbital a 40 rpm a 25 °C. El hidrogel se deshidrató refrescando la acetona después de una incubación durante la noche seguida de 5 lavados de 1 hora y otra incubación durante la noche. La acetona se refrescó después de cada lavado para eliminar el agua del gel.

Después de la deshidratación en acetona, el gel de colágeno se incubó en una solución de engrasado que contenía 20 % (v/v) de aceite de hígado de bacalao o aceite de ricino en acetona o etanol al 80 %, respectivamente, durante la noche mientras se agitaba a 40 rpm.

Después de la incubación en la solución de engrasado, el gel de colágeno se secó a 37 °C. Después del secado, el material se hizo más blando y parecido al cuero o un cuero biofabricado. Se puede eliminar el exceso de aceite para mejorar la estética similar a la piel de los materiales.

5 El cuero biofabricado tenía una textura granulada tanto en la superficie superior como en la inferior, y absorbía constantemente tintes tanto en la superficie superior como en la inferior.

### 10 Ejemplo 3

#### 15 Producción de cuero biofabricado a partir de colágeno de tipo III

Una solución de colágeno recombinante de tipo III a 2,5 mg/ml en HCl 0,01 N (FibroGen, Inc.) se fibriló añadiendo 1 parte de una solución de fosfato de sodio 200 mM (22 ml), a pH 11,2 a 9 partes de la solución de colágeno (200 ml) para aumentar el pH a 7 y se agitó 2 horas a temperatura ambiente.

La fibrilación se confirmó midiendo la absorbancia a 400 nm de la solución a lo largo del tiempo.

20 Después de la fibrilación, las fibrillas se curtieron añadiendo Relugan GTW (2 % p/p sobre el colágeno) a la suspensión de fibrillas y mezclando durante 30 minutos.

Las fibrillas de colágeno curtidas se centrifugaron después a 3.500 RPM durante 30 minutos para concentrar las fibrillas a una concentración de 10 mg/ml. El sedimento de fibrillas de 10 mg/ml se centrifugó adicionalmente usando una ultracentrífuga a 21.000 rpm durante 30 minutos, produciendo un gel de fibrilla con una concentración de ~ 40-50 mg/ml.

Las propiedades físicas del gel de fibrilla se evaluaron con un reómetro.

30 El módulo de almacenamiento y la viscosidad compleja demuestran un material principalmente elástico.

Este gel de fibrilla se secó después en un deshidratador de alimentos ajustado a 37 °C durante 18 horas.

35 Después del secado, el material se tiñó y recurtió incubando en una solución de tinte negro ácido Lowepel (2 % p/p en el colágeno) y Lubritan WP (20 % p/p en el colágeno).

El material se centrifugó en tambor en esta solución y se exprimió para garantizar la penetración del tinte y el syntan en el material. A continuación, el material se secó finalmente y se apiló para producir un material similar al cuero.

### 40 Ejemplo 4

#### 45 Producción de cuero biofabricado a partir de colágeno de tipo III

El colágeno recombinante de tipo III se adquirió de Fibrogen, Inc. El colágeno se suministró a una concentración de 2,5 mg/ml en HCl 0,01 N.

45 Para iniciar el ensamblaje de las fibrillas de colágeno, se añadió 1 parte de Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 200 mM a pH 11,2 (100 ml) a 9 partes de la solución madre de colágeno de tipo III a temperatura ambiente para llevar la solución a pH 7,2. La solución se mezcló a 1.600 rpm durante 1 hora usando un mezclador superior.

50 Después de 1 hora de agitación, las fibrillas de colágeno se hicieron reaccionar con Relugan GTW, que se añadió a la solución con una oferta del 2 % (p/p) sobre la masa del colágeno. La solución se mezcló a 1.600 rpm durante 1 hora usando un mezclador superior.

55 A continuación se añadió Lipoderm A1 y Tanigan FT a la solución con ofertas del 80 % (p/p) cada uno sobre la masa del colágeno. La solución se mezcló a 1.600 rpm durante 30 minutos usando un mezclador superior. Después, el pH de la solución se redujo a 4 usando una solución de ácido fórmico al 10 % (v/v). La solución se mezcló a 1.600 rpm durante 30 minutos usando un mezclador superior.

60 A continuación, se filtraron 144 ml de la solución a través de una membrana Whatman n.º1 de 47 mm usando un embudo de Buchner fijado a una bomba de vacío (presión de -27 mmHg) y un dique de caucho encima del embudo de Buchner. El vacío se extrajo durante 18 horas.

65 El tejido de fibrilla concentrado se dejó secar en condiciones ambientales y se apiló manualmente durante 30 minutos mediante laminado, doblando y tirando del material para producir un material similar al cuero.

### Ejemplo 5

**Expancell**

5 El colágeno bovino de tipo I, aislado del tendón bovino por tratamiento ácido seguido de digestión con pepsina y purificado por cromatografía de exclusión por tamaño, congelado y liofilizado, se adquirió de Wuxi Biot Bio-technology co., Ltd. (Medical Collagen Sponge).

10 Usando un mezclador superior, se disolvieron 10 g de la proteína de colágeno liofilizada mezclando a 1.600 rpm en 1 l de HCl 0,01 N, a pH 2, durante al menos una hora hasta que no había presente una esponja de colágeno sólido.

A continuación, se añadieron 111,1 ml de fosfato de sodio 200 mM (pH ajustado a 11,2 con hidróxido de sodio) para elevar el pH de la solución de colágeno a 7,2.

15 La solución de colágeno a pH 7,2 se agitó luego durante 10 minutos y 0,1 ml de un Relugan GTW al 20 % (BASF) como reticulante, que era del 2 % en peso de colágeno, se añadió para producir fibrillas de colágeno reticuladas.

Las fibrillas de colágeno reticuladas se mezclaron después con 5 ml de Tanigan FT (Lanxess) al 20 % y se agitaron durante una hora.

20 Posteriormente, se añadió 1 g de microesferas Expancel 461 WE 20 d36 (AkzoNobel), que es el 10 % del peso del colágeno) y 40 ml de Truposol Ben (Trumpler), que es el 80 % del peso del colágeno, y se agitaron durante una hora adicional usando un agitador superior.

25 El pH de la solución se redujo a pH 4,0 mediante la adición de ácido fórmico al 10 % y se agitó durante una hora.

Después de la reducción del pH, se filtraron 150 ml de la solución a través de una membrana Whatman N.º 1 de 90 mm usando un embudo Buchner fijado a una bomba de vacío a una presión de -27 mmHg.

30 El tejido de fibrilla concentrado se dejó secar en condiciones ambientales y se apiló manualmente durante 30 minutos mediante laminado, doblando y tirando del material para producir un material similar al cuero.

**Ejemplo 6****Dióxido de titanio (pigmento blanco)**

35 El colágeno bovino de tipo I se adquirió de Wuxi Biot Bio-technology co., Ltd. (Medical Collagen Sponge). Esta fuente de colágeno es colágeno de tipo I aislado del tendón bovino mediante tratamiento ácido seguido de digestión con pepsina y purificado mediante cromatografía de exclusión por tamaño, se congeló y se liofilizó. La proteína liofilizada (10 gramos) se disolvió en 1 l de HCl 0,01 N, a pH 2 usando un mezclador superior. Después de disolver adecuadamente el colágeno, como lo demuestra la falta de una esponja de colágeno sólido en la solución (al menos 40 1 hora de mezcla a 1.600 rpm), 111,1 ml de fosfato de sodio 200 milimolar (pH ajustado a 11,2 con hidróxido de sodio) para elevar el pH de la solución a 7,2. La solución de colágeno resultante se agitó durante 10 minutos y 0,1 ml de una solución de reticulante Relugan GTW (BASF) al 20 %, que era el 2 % en el peso de colágeno.

45 A la solución de fibrillas de colágeno reticulado se añadieron 5 ml de Tanigan FT (Lanxess) al 20 % seguido de agitación durante una hora.

50 Después de la adición de Tanigan-FT, se añadieron 1 g de Microesferas Expancel (10 % en peso de colágeno) 461 WE 20 d36 (AkzoNobel), 40 ml (80 % en peso de colágeno) de Truposol Ben (Trumpler) y 2 ml (10 % en peso de colágeno) de PPE White HS a pa (Stahl) y se agitó durante una hora adicional usando un agitador superior.

El pH de la solución se redujo a 4,0 usando ácido fórmico al 10 % y se agitó durante una hora.

55 Después del cambio de pH, se filtraron 150 ml de la solución a través de una membrana Whatman N.º 1 de 90 mm usando un embudo Buchner fijado a una bomba de vacío a una presión de -27 mmHg.

El tejido de fibrilla concentrado se dejó secar en condiciones ambientales y se apiló manualmente durante 30 minutos mediante laminado, doblando y tirando del material para producir un material similar al cuero.

**Ejemplo 7****Resina Hycar (26552)**

65 El colágeno bovino se adquirió de Wuxi Biot Bio-technology co., Ltd. (Medical Collagen Sponge). Esta fuente de colágeno es colágeno de tipo I aislado del tendón bovino mediante tratamiento ácido seguido de digestión con pepsina y purificado mediante cromatografía de exclusión por tamaño, se congeló y se liofilizó.

5 La proteína liofilizada (10 gramos) se disolvió en 1 litro de HCl 0,01 N, a pH 2 usando un mezclador superior. Después de disolver adecuadamente el colágeno, como lo demuestra la falta de una esponja de colágeno sólido en la solución (al menos 1 hora de mezcla a 1.600 rpm), 111,1 ml de fosfato de sodio 200 mM (pH ajustado a 11,2 con hidróxido de sodio) para elevar el pH de la solución a 7,2.

La solución de colágeno resultante se agitó durante 10 minutos y 0,1 ml de una solución de reticulante Relugan GTW (BASF) al 20 %, que era el 2 % del peso del colágeno, se añadió solución de agente de curtido.

10 A la solución de fibrillas de colágeno reticulado se añadieron 5 ml de Tanigan FT (Lanxess) al 20 % y se agitó durante una hora. Después de la adición de Tanigan-FT, se añadieron 1 g de Microesferas Expancel (10 % en peso de colágeno) 461 WE 20 d36 (AkzoNobel), 40 ml (80 % en peso de colágeno) de Truposol Ben (Trumpler) y 2 ml (10 % en peso de colágeno) de PPE White HS a pa (Stahl) y se agitó durante una hora adicional usando un agitador superior.

15 El pH de la solución se redujo a 4,0 usando ácido fórmico al 10 % y se añadieron diversas ofertas de Resina Hycar 26552 (Lubrizol) y se agitó durante una hora adicional. Después del cambio de pH y la adición de resina, se filtraron 150 ml de la solución a través de una membrana Whatman n.º 1 de 90 milímetros usando un embudo Buchner fijado a una bomba de vacío a una presión de -27 mmHg. Para facilitar la activación, la resina Hycar 26552 se mezcla con la solución de fibrillas y se calienta a 50 °C durante 2 horas.

20 El tejido de fibrilla concentrado se dejó secar en condiciones ambientales y se apiló manualmente durante 30 minutos mediante laminado, doblando y tirando del material para producir un material similar al cuero. La adición de resina condujo a propiedades mecánicas mejoradas como se muestra a continuación en la figura 1.

Ejemplo	Sustratos	Reticulante	Deshidratador	Lubricante	Resultado
5	Colágeno de tipo I + microesferas ExpandCell	Relugan GTW	Tanigan FT	Truposol	Material similar al cuero
6	"	"	"	"	Material similar al cuero
7	"	"	"	"	Material similar al cuero, mejores propiedades mecánicas

25 Relugan es un agente recurtiente a base de polímero, resina o aldehído. Tanigan es un syntan a base de sulfona. Truposol Ben es un engrasador para cuero sin cromo. Lipoderm Liquor A1 es un engrasador a base de alcohol de cadena larga, parafina, tensioactivos aniónicos, en agua resina Hycar 26552: Emulsión a base de acrílico libre de formaldehído.

30 **INTERPRETACIÓN DE LA DESCRIPCIÓN**

La terminología utilizada en el presente documento tiene el propósito de describir realizaciones particulares solamente y no pretende ser limitante de la invención. Por ejemplo, tal como se usa en el presente documento, las formas singulares "un", "uno/una" y "el" "la" pretenden incluir las formas plurales también, a menos que el contexto indique claramente otra cosa. Se entenderá además que los términos "comprende" y/o "que comprende", cuando se usan en esta memoria descriptiva, especifican la presencia de características, etapas, operaciones, elementos y/o componentes declarados, pero no excluyen la presencia o adición de una o más de otras características, etapas, operaciones, elementos, componentes y/o grupos de los mismos. Tal como se usa en el presente documento, el término "y/o" incluye todas y cada una de las combinaciones de uno o más de los elementos enumerados asociados y puede abreviarse como "/".

45 Los términos espacialmente relativos, tales como "debajo", "abajo", "inferior", "encima", "superior" y similares, pueden usarse en el presente documento para facilitar la descripción para describir la relación de un elemento o característica con otro(s) elemento(s) o característica(s) como se ilustra en las figuras. Se entenderá que los términos espacialmente relativos pretenden abarcar diferentes orientaciones del dispositivo u operación en uso además de la orientación representada en las figuras. Por ejemplo, si un dispositivo en las figuras está invertido, los elementos descritos como "debajo" o "por debajo" de otros elementos o características se orientarían "sobre" los otros elementos o características. Por tanto, el término de ejemplo "debajo" puede abarcar tanto una orientación de arriba como de abajo. El dispositivo puede estar orientado de otro modo (girado 90 grados o en otras orientaciones) y los descriptores espacialmente relativos utilizados en el presente documento pueden interpretarse en consecuencia. De forma similar, los términos "hacia arriba", "hacia abajo", "vertical", "horizontal" y similares se usan en el presente documento solo con fines explicativos a menos que se indique específicamente lo contrario.

55 Aunque los términos "primero" y "segundo" pueden usarse en el presente documento para describir varias características/elementos (incluidos las etapas), estas características/elementos no deben estar limitados por estos términos, a menos que el contexto indique lo contrario. Estos términos pueden usarse para distinguir una

característica/elemento de otra característica/elemento. Por tanto, una primera característica/elemento discutido a continuación podría denominarse una segunda característica/elemento, y de manera similar, una segunda característica/elemento discutido a continuación podría denominarse una primera característica/elemento sin apartarse de las enseñanzas de la presente invención.

5 A lo largo de la presente memoria descriptiva y de las reivindicaciones que la siguen, a no ser que el contexto requiera lo contrario, la palabra "comprende", y variaciones tales como "comprenden" y "que comprende" significa que varios componentes se pueden emplear conjuntamente en los procedimientos y artículos (por ejemplo, composiciones y aparatos, que incluyen dispositivos y procedimientos). Por ejemplo, se entenderá que la expresión "que comprende" implica la inclusión de cualquier elemento o etapa establecida, pero no la exclusión de cualquier otro elemento o etapa.

15 Como se usa en el presente documento en la memoria descriptiva y las reivindicaciones, que incluye como se usa en los ejemplos y, a menos que se especifique expresamente lo contrario, todos los números pueden leerse como precedidos por la palabra "sustancialmente", "alrededor de" o "aproximadamente" incluso si el término no aparece de forma expresa. Los términos "sustancialmente", "sin sustancialmente", "sustancialmente libre de", "aproximadamente" o "alrededor de" se puede usar cuando se describe la magnitud y/o posición para indicar que el valor y/o la posición descrita está dentro de un intervalo de valores y/o posiciones razonable esperado. Por ejemplo, un valor numérico puede tener un valor que es +/- 0,1 % del valor establecido (o intervalo de valores), +/- 1 % del valor establecido (o intervalo de valores), +/- 2 % del valor establecido (o intervalo de valores), +/- 5 % del valor establecido (o intervalo de valores), +/- 10 % del valor establecido (o intervalo de valores), etc. Cualquier intervalo numérico citado en el presente documento pretende incluir todos los subintervalos subincluidos en el mismo.

25 Cuando en el presente documento se hace referencia a una característica o elemento como "en" otra característica o elemento, puede estar directamente en la otra característica o elemento o también pueden estar presentes características y/o elementos intermedios. En cambio, cuando se hace referencia a una característica o elemento como "directamente en" otra característica o elemento, no hay características o elementos intermedios presentes. También se entenderá que, cuando se hace referencia a una característica o elemento como "conectado", "fijado" o "acoplado" a otra característica o elemento, puede estar conectado directamente, fijado o acoplado a la otra característica o elemento o pueden estar presentes características o elementos intermedios. Por el contrario, cuando se hace referencia a una característica o elemento como "conectado directamente", "directamente fijado" o "directamente acoplado" a otra característica o elemento, no hay características o elementos intermedios presentes. Aunque descritos o mostrados con respecto a una realización, las características y elementos así descritos o mostrados pueden aplicarse a otras realizaciones. Los expertos en la técnica también apreciarán que las referencias a una estructura o característica que está dispuesta "adyacente" a otra característica pueden tener porciones que se superponen o subyacen a la característica adyacente.

40 Aunque varias realizaciones ilustrativas se han descrito anteriormente, se puede realizar cualquiera de una serie de cambios a diversas realizaciones sin apartarse del alcance de la invención como se describe en las reivindicaciones. Por ejemplo, el orden en el que se realizan varias etapas del procedimiento descrito a menudo se puede cambiar en realizaciones alternativas, y en otras realizaciones alternativas se pueden omitir una o más etapas del procedimiento por completo. Las características opcionales de varias realizaciones de dispositivos y sistemas pueden incluirse en algunas realizaciones y no en otras. Por lo tanto, la descripción anterior se proporciona principalmente con fines de ejemplo y no debe interpretarse que limita el alcance de la invención tal como se establece en las reivindicaciones.

45 Los ejemplos e ilustraciones incluidos en el presente documento muestran, a modo de ilustración y no de limitación, realizaciones específicas en las que se puede practicar el objeto. Como se ha mencionado, otras realizaciones se pueden usar y realizar derivaciones de las mismas, de manera que se puedan realizar sustituciones y cambios estructurales y lógicos sin apartarse del alcance de la presente divulgación. La invención es tal como se define en las reivindicaciones.

50 LISTADO DE SECUENCIAS

<110> Modern Meadow, Inc.

55 <120> MATERIAL BIOFABRICADO QUE CONTIENE FIBRILLAS DE COLÁGENO

<130> 500566WO

<150> US 62/295.435

60 <151> 15-02-2016

<160> 3

<170> PatentIn versión 3.5

65 <210> 1

ES 2 812 249 T3

<211> 1463  
 <212> PRT  
 <213> *Bos taurus*

5 <220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <222> (1) .. (1463)  
 <223> precursor de cadena de colágeno alfa-1(I)

10 <400> 1

```

Met Phe Ser Phe Val Asp Leu Arg Leu Leu Leu Leu Leu Ala Ala Thr
 1           5           10           15

Ala Leu Leu Thr His Gly Gln Glu Glu Gly Gln Glu Glu Gly Gln Glu
 20           25           30

Glu Asp Ile Pro Pro Val Thr Cys Val Gln Asn Gly Leu Arg Tyr His
 35           40           45

Asp Arg Asp Val Trp Lys Pro Val Pro Cys Gln Ile Cys Val Cys Asp
 50           55           60

Asn Gly Asn Val Leu Cys Asp Asp Val Ile Cys Asp Glu Leu Lys Asp
 65           70           75

Cys Pro Asn Ala Lys Val Pro Thr Asp Glu Cys Cys Pro Val Cys Pro
 85           90           95

Glu Gly Gln Glu Ser Pro Thr Asp Gln Glu Thr Thr Gly Val Glu Gly
 100          105          110

Pro Lys Gly Asp Thr Gly Pro Arg Gly Pro Arg Gly Pro Ala Gly Pro
 115          120          125

Pro Gly Arg Asp Gly Ile Pro Gly Gln Pro Gly Leu Pro Gly Pro Pro
 130          135          140
  
```

ES 2 812 249 T3

Gly Pro Pro Gly Pro Pro Gly Pro Pro Gly Leu Gly Gly Asn Phe Ala  
 145 150 155 160

Pro Gln Leu Ser Tyr Gly Tyr Asp Glu Lys Ser Thr Gly Ile Ser Val  
 165 170 175

Pro Gly Pro Met Gly Pro Ser Gly Pro Arg Gly Leu Pro Gly Pro Pro  
 180 185 190

Gly Ala Pro Gly Pro Gln Gly Phe Gln Gly Pro Pro Gly Glu Pro Gly  
 195 200 205

Glu Pro Gly Ala Ser Gly Pro Met Gly Pro Arg Gly Pro Pro Gly Pro  
 210 215 220

Pro Gly Lys Asn Gly Asp Asp Gly Glu Ala Gly Lys Pro Gly Arg Pro  
 225 230 235 240

Gly Glu Arg Gly Pro Pro Gly Pro Gln Gly Ala Arg Gly Leu Pro Gly  
 245 250 255

Thr Ala Gly Leu Pro Gly Met Lys Gly His Arg Gly Phe Ser Gly Leu  
 260 265 270

Asp Gly Ala Lys Gly Asp Ala Gly Pro Ala Gly Pro Lys Gly Glu Pro  
 275 280 285

Gly Ser Pro Gly Glu Asn Gly Ala Pro Gly Gln Met Gly Pro Arg Gly  
 290 295 300

Leu Pro Gly Glu Arg Gly Arg Pro Gly Ala Pro Gly Pro Ala Gly Ala  
 305 310 315 320

Arg Gly Asn Asp Gly Ala Thr Gly Ala Ala Gly Pro Pro Gly Pro Thr  
 325 330 335

Gly Pro Ala Gly Pro Pro Gly Phe Pro Gly Ala Val Gly Ala Lys Gly  
 340 345 350

Glu Gly Gly Pro Gln Gly Pro Arg Gly Ser Glu Gly Pro Gln Gly Val  
 355 360 365

Arg Gly Glu Pro Gly Pro Pro Gly Pro Ala Gly Ala Ala Gly Pro Ala  
 370 375 380

Gly Asn Pro Gly Ala Asp Gly Gln Pro Gly Ala Lys Gly Ala Asn Gly  
 385 390 395 400

ES 2 812 249 T3

Ala Pro Gly Ile Ala Gly Ala Pro Gly Phe Pro Gly Ala Arg Gly Pro  
 405 410 415

Ser Gly Pro Gln Gly Pro Ser Gly Pro Pro Gly Pro Lys Gly Asn Ser  
 420 425 430

Gly Glu Pro Gly Ala Pro Gly Ser Lys Gly Asp Thr Gly Ala Lys Gly  
 435 440 445

Glu Pro Gly Pro Thr Gly Ile Gln Gly Pro Pro Gly Pro Ala Gly Glu  
 450 455 460

Glu Gly Lys Arg Gly Ala Arg Gly Glu Pro Gly Pro Ala Gly Leu Pro  
 465 470 475 480

Gly Pro Pro Gly Glu Arg Gly Gly Pro Gly Ser Arg Gly Phe Pro Gly  
 485 490 495

Ala Asp Gly Val Ala Gly Pro Lys Gly Pro Ala Gly Glu Arg Gly Ala  
 500 505 510

Pro Gly Pro Ala Gly Pro Lys Gly Ser Pro Gly Glu Ala Gly Arg Pro  
 515 520 525

Gly Glu Ala Gly Leu Pro Gly Ala Lys Gly Leu Thr Gly Ser Pro Gly  
 530 535 540

Ser Pro Gly Pro Asp Gly Lys Thr Gly Pro Pro Gly Pro Ala Gly Gln  
 545 550 555 560

Asp Gly Arg Pro Gly Pro Pro Gly Pro Pro Gly Ala Arg Gly Gln Ala  
 565 570 575

Gly Val Met Gly Phe Pro Gly Pro Lys Gly Ala Ala Gly Glu Pro Gly  
 580 585 590

Lys Ala Gly Glu Arg Gly Val Pro Gly Pro Pro Gly Ala Val Gly Pro  
 595 600 605

Ala Gly Lys Asp Gly Glu Ala Gly Ala Gln Gly Pro Pro Gly Pro Ala  
 610 615 620

Gly Pro Ala Gly Glu Arg Gly Glu Gln Gly Pro Ala Gly Ser Pro Gly  
 625 630 635 640

Phe Gln Gly Leu Pro Gly Pro Ala Gly Pro Pro Gly Glu Ala Gly Lys

ES 2 812 249 T3

				645					650						655	
Pro	Gly	Glu	Gln	Gly	Val	Pro	Gly	Asp	Leu	Gly	Ala	Pro	Gly	Pro	Ser	
			660					665					670			
Gly	Ala	Arg	Gly	Glu	Arg	Gly	Phe	Pro	Gly	Glu	Arg	Gly	Val	Gln	Gly	
		675					680					685				
Pro	Pro	Gly	Pro	Ala	Gly	Pro	Arg	Gly	Ala	Asn	Gly	Ala	Pro	Gly	Asn	
	690					695					700					
Asp	Gly	Ala	Lys	Gly	Asp	Ala	Gly	Ala	Pro	Gly	Ala	Pro	Gly	Ser	Gln	
705					710					715					720	
Gly	Ala	Pro	Gly	Leu	Gln	Gly	Met	Pro	Gly	Glu	Arg	Gly	Ala	Ala	Gly	
				725					730						735	
Leu	Pro	Gly	Pro	Lys	Gly	Asp	Arg	Gly	Asp	Ala	Gly	Pro	Lys	Gly	Ala	
			740					745					750			
Asp	Gly	Ala	Pro	Gly	Lys	Asp	Gly	Val	Arg	Gly	Leu	Thr	Gly	Pro	Ile	
		755					760					765				
Gly	Pro	Pro	Gly	Pro	Ala	Gly	Ala	Pro	Gly	Asp	Lys	Gly	Glu	Ala	Gly	
	770					775					780					
Pro	Ser	Gly	Pro	Ala	Gly	Pro	Thr	Gly	Ala	Arg	Gly	Ala	Pro	Gly	Asp	
785					790					795					800	
Arg	Gly	Glu	Pro	Gly	Pro	Pro	Gly	Pro	Ala	Gly	Phe	Ala	Gly	Pro	Pro	
				805					810					815		
Gly	Ala	Asp	Gly	Gln	Pro	Gly	Ala	Lys	Gly	Glu	Pro	Gly	Asp	Ala	Gly	
			820					825					830			
Ala	Lys	Gly	Asp	Ala	Gly	Pro	Pro	Gly	Pro	Ala	Gly	Pro	Ala	Gly	Pro	
		835					840					845				
Pro	Gly	Pro	Ile	Gly	Asn	Val	Gly	Ala	Pro	Gly	Pro	Lys	Gly	Ala	Arg	
	850					855						860				
Gly	Ser	Ala	Gly	Pro	Pro	Gly	Ala	Thr	Gly	Phe	Pro	Gly	Ala	Ala	Gly	
865					870					875					880	
Arg	Val	Gly	Pro	Pro	Gly	Pro	Ser	Gly	Asn	Ala	Gly	Pro	Pro	Gly	Pro	
				885					890					895		

ES 2 812 249 T3

Pro Gly Pro Ala Gly Lys Glu Gly Ser Lys Gly Pro Arg Gly Glu Thr  
 900 905 910

Gly Pro Ala Gly Arg Pro Gly Glu Val Gly Pro Pro Gly Pro Pro Gly  
 915 920 925

Pro Ala Gly Glu Lys Gly Ala Pro Gly Ala Asp Gly Pro Ala Gly Ala  
 930 935 940

Pro Gly Thr Pro Gly Pro Gln Gly Ile Ala Gly Gln Arg Gly Val Val  
 945 950 955 960

Gly Leu Pro Gly Gln Arg Gly Glu Arg Gly Phe Pro Gly Leu Pro Gly  
 965 970 975

Pro Ser Gly Glu Pro Gly Lys Gln Gly Pro Ser Gly Ala Ser Gly Glu  
 980 985 990

Arg Gly Pro Pro Gly Pro Met Gly Pro Pro Gly Leu Ala Gly Pro Pro  
 995 1000 1005

Gly Glu Ser Gly Arg Glu Gly Ala Pro Gly Ala Glu Gly Ser Pro  
 1010 1015 1020

Gly Arg Asp Gly Ser Pro Gly Ala Lys Gly Asp Arg Gly Glu Thr  
 1025 1030 1035

Gly Pro Ala Gly Pro Pro Gly Ala Pro Gly Ala Pro Gly Ala Pro  
 1040 1045 1050

Gly Pro Val Gly Pro Ala Gly Lys Ser Gly Asp Arg Gly Glu Thr  
 1055 1060 1065

Gly Pro Ala Gly Pro Ala Gly Pro Ile Gly Pro Val Gly Ala Arg  
 1070 1075 1080

Gly Pro Ala Gly Pro Gln Gly Pro Arg Gly Asp Lys Gly Glu Thr  
 1085 1090 1095

Gly Glu Gln Gly Asp Arg Gly Ile Lys Gly His Arg Gly Phe Ser  
 1100 1105 1110

Gly Leu Gln Gly Pro Pro Gly Pro Pro Gly Ser Pro Gly Glu Gln  
 1115 1120 1125

Gly Pro Ser Gly Ala Ser Gly Pro Ala Gly Pro Arg Gly Pro Pro  
 1130 1135 1140

ES 2 812 249 T3

Gly Ser Ala Gly Ser Pro Gly Lys Asp Gly Leu Asn Gly Leu Pro  
 1145 1150 1155

Gly Pro Ile Gly Pro Pro Gly Pro Arg Gly Arg Thr Gly Asp Ala  
 1160 1165 1170

Gly Pro Ala Gly Pro Pro Gly Pro Pro Gly Pro Pro Gly Pro Pro  
 1175 1180 1185

Gly Pro Pro Ser Gly Gly Tyr Asp Leu Ser Phe Leu Pro Gln Pro  
 1190 1195 1200

Pro Gln Glu Lys Ala His Asp Gly Gly Arg Tyr Tyr Arg Ala Asp  
 1205 1210 1215

Asp Ala Asn Val Val Arg Asp Arg Asp Leu Glu Val Asp Thr Thr  
 1220 1225 1230

Leu Lys Ser Leu Ser Gln Gln Ile Glu Asn Ile Arg Ser Pro Glu  
 1235 1240 1245

Gly Ser Arg Lys Asn Pro Ala Arg Thr Cys Arg Asp Leu Lys Met  
 1250 1255 1260

Cys His Ser Asp Trp Lys Ser Gly Glu Tyr Trp Ile Asp Pro Asn  
 1265 1270 1275

Gln Gly Cys Asn Leu Asp Ala Ile Lys Val Phe Cys Asn Met Glu  
 1280 1285 1290

Thr Gly Glu Thr Cys Val Tyr Pro Thr Gln Pro Ser Val Ala Gln  
 1295 1300 1305

Lys Asn Trp Tyr Ile Ser Lys Asn Pro Lys Glu Lys Arg His Val  
 1310 1315 1320

Trp Tyr Gly Glu Ser Met Thr Gly Gly Phe Gln Phe Glu Tyr Gly  
 1325 1330 1335

Gly Gln Gly Ser Asp Pro Ala Asp Val Ala Ile Gln Leu Thr Phe  
 1340 1345 1350

Leu Arg Leu Met Ser Thr Glu Ala Ser Gln Asn Ile Thr Tyr His  
 1355 1360 1365

Cys Lys Asn Ser Val Ala Tyr Met Asp Gln Gln Thr Gly Asn Leu  
 1370 1375 1380

ES 2 812 249 T3

Lys Lys Ala Leu Leu Leu Gln Gly Ser Asn Glu Ile Glu Ile Arg  
 1385 1390 1395

Ala Glu Gly Asn Ser Arg Phe Thr Tyr Ser Val Thr Tyr Asp Gly  
 1400 1405 1410

Cys Thr Ser His Thr Gly Ala Trp Gly Lys Thr Val Ile Glu Tyr  
 1415 1420 1425

Lys Thr Thr Lys Thr Ser Arg Leu Pro Ile Ile Asp Val Ala Pro  
 1430 1435 1440

Leu Asp Val Gly Ala Pro Asp Gln Glu Phe Gly Phe Asp Val Gly  
 1445 1450 1455

Pro Ala Cys Phe Leu  
 1460

<210> 2  
 <211> 1364  
 <212> PRT  
 <213> *Bos taurus*

<220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <222> (1)..(1364)  
 <223> precursor de cadena de colágeno alfa-2(I)

<400> 2

Met Leu Ser Phe Val Asp Thr Arg Thr Leu Leu Leu Leu Ala Val Thr  
 1 5 10 15

Ser Cys Leu Ala Thr Cys Gln Ser Leu Gln Glu Ala Thr Ala Arg Lys  
 20 25 30

Gly Pro Ser Gly Asp Arg Gly Pro Arg Gly Glu Arg Gly Pro Pro Gly  
 35 40 45

Pro Pro Gly Arg Asp Gly Asp Asp Gly Ile Pro Gly Pro Pro Gly Pro  
 50 55 60

Pro Gly Pro Pro Gly Pro Pro Gly Leu Gly Gly Asn Phe Ala Ala Gln  
 65 70 75 80

Phe Asp Ala Lys Gly Gly Gly Pro Gly Pro Met Gly Leu Met Gly Pro  
 85 90 95

5

10

15

ES 2 812 249 T3

Arg Gly Pro Pro Gly Ala Ser Gly Ala Pro Gly Pro Gln Gly Phe Gln  
100 105 110

Gly Pro Pro Gly Glu Pro Gly Glu Pro Gly Gln Thr Gly Pro Ala Gly  
115 120 125

Ala Arg Gly Pro Pro Gly Pro Pro Gly Lys Ala Gly Glu Asp Gly His  
130 135 140

Pro Gly Lys Pro Gly Arg Pro Gly Glu Arg Gly Val Val Gly Pro Gln  
145 150 155 160

Gly Ala Arg Gly Phe Pro Gly Thr Pro Gly Leu Pro Gly Phe Lys Gly  
165 170 175

Ile Arg Gly His Asn Gly Leu Asp Gly Leu Lys Gly Gln Pro Gly Ala  
180 185 190

Pro Gly Val Lys Gly Glu Pro Gly Ala Pro Gly Glu Asn Gly Thr Pro  
195 200 205

Gly Gln Thr Gly Ala Arg Gly Leu Pro Gly Glu Arg Gly Arg Val Gly  
210 215 220

Ala Pro Gly Pro Ala Gly Ala Arg Gly Ser Asp Gly Ser Val Gly Pro  
225 230 235 240

Val Gly Pro Ala Gly Pro Ile Gly Ser Ala Gly Pro Pro Gly Phe Pro  
245 250 255

Gly Ala Pro Gly Pro Lys Gly Glu Leu Gly Pro Val Gly Asn Pro Gly  
260 265 270

Pro Ala Gly Pro Ala Gly Pro Arg Gly Glu Val Gly Leu Pro Gly Leu  
275 280 285

Ser Gly Pro Val Gly Pro Pro Gly Asn Pro Gly Ala Asn Gly Leu Pro  
290 295 300

Gly Ala Lys Gly Ala Ala Gly Leu Pro Gly Val Ala Gly Ala Pro Gly  
305 310 315 320

Leu Pro Gly Pro Arg Gly Ile Pro Gly Pro Val Gly Ala Ala Gly Ala  
325 330 335

Thr Gly Ala Arg Gly Leu Val Gly Glu Pro Gly Pro Ala Gly Ser Lys  
340 345 350

ES 2 812 249 T3

Gly Glu Ser Gly Asn Lys Gly Glu Pro Gly Ala Val Gly Gln Pro Gly  
 355 360 365

Pro Pro Gly Pro Ser Gly Glu Glu Gly Lys Arg Gly Ser Thr Gly Glu  
 370 375 380

Ile Gly Pro Ala Gly Pro Pro Gly Pro Pro Gly Leu Arg Gly Asn Pro  
 385 390 395 400

Gly Ser Arg Gly Leu Pro Gly Ala Asp Gly Arg Ala Gly Val Met Gly  
 405 410 415

Pro Ala Gly Ser Arg Gly Ala Thr Gly Pro Ala Gly Val Arg Gly Pro  
 420 425 430

Asn Gly Asp Ser Gly Arg Pro Gly Glu Pro Gly Leu Met Gly Pro Arg  
 435 440 445

Gly Phe Pro Gly Ser Pro Gly Asn Ile Gly Pro Ala Gly Lys Glu Gly  
 450 455 460

Pro Val Gly Leu Pro Gly Ile Asp Gly Arg Pro Gly Pro Ile Gly Pro  
 465 470 475 480

Ala Gly Ala Arg Gly Glu Pro Gly Asn Ile Gly Phe Pro Gly Pro Lys  
 485 490 495

Gly Pro Ser Gly Asp Pro Gly Lys Ala Gly Glu Lys Gly His Ala Gly  
 500 505 510

Leu Ala Gly Ala Arg Gly Ala Pro Gly Pro Asp Gly Asn Asn Gly Ala  
 515 520 525

Gln Gly Pro Pro Gly Leu Gln Gly Val Gln Gly Gly Lys Gly Glu Gln  
 530 535 540

Gly Pro Ala Gly Pro Pro Gly Phe Gln Gly Leu Pro Gly Pro Ala Gly  
 545 550 555 560

Thr Ala Gly Glu Ala Gly Lys Pro Gly Glu Arg Gly Ile Pro Gly Glu  
 565 570 575

Phe Gly Leu Pro Gly Pro Ala Gly Ala Arg Gly Glu Arg Gly Pro Pro  
 580 585 590

Gly Glu Ser Gly Ala Ala Gly Pro Thr Gly Pro Ile Gly Ser Arg Gly  
 595 600 605

ES 2 812 249 T3

Pro Ser Gly Pro Pro Gly Pro Asp Gly Asn Lys Gly Glu Pro Gly Val  
610 615 620

Val Gly Ala Pro Gly Thr Ala Gly Pro Ser Gly Pro Ser Gly Leu Pro  
625 630 635 640

Gly Glu Arg Gly Ala Ala Gly Ile Pro Gly Gly Lys Gly Glu Lys Gly  
645 650 655

Glu Thr Gly Leu Arg Gly Asp Ile Gly Ser Pro Gly Arg Asp Gly Ala  
660 665 670

Arg Gly Ala Pro Gly Ala Ile Gly Ala Pro Gly Pro Ala Gly Ala Asn  
675 680 685

Gly Asp Arg Gly Glu Ala Gly Pro Ala Gly Pro Ala Gly Pro Ala Gly  
690 695 700

Pro Arg Gly Ser Pro Gly Glu Arg Gly Glu Val Gly Pro Ala Gly Pro  
705 710 715 720

Asn Gly Phe Ala Gly Pro Ala Gly Ala Ala Gly Gln Pro Gly Ala Lys  
725 730 735

Gly Glu Arg Gly Thr Lys Gly Pro Lys Gly Glu Asn Gly Pro Val Gly  
740 745 750

Pro Thr Gly Pro Val Gly Ala Ala Gly Pro Ser Gly Pro Asn Gly Pro  
755 760 765

Pro Gly Pro Ala Gly Ser Arg Gly Asp Gly Gly Pro Pro Gly Ala Thr  
770 775 780

Gly Phe Pro Gly Ala Ala Gly Arg Thr Gly Pro Pro Gly Pro Ser Gly  
785 790 795 800

Ile Ser Gly Pro Pro Gly Pro Pro Gly Pro Ala Gly Lys Glu Gly Leu  
805 810 815

Arg Gly Pro Arg Gly Asp Gln Gly Pro Val Gly Arg Ser Gly Glu Thr  
820 825 830

Gly Ala Ser Gly Pro Pro Gly Phe Val Gly Glu Lys Gly Pro Ser Gly  
835 840 845

Glu Pro Gly Thr Ala Gly Pro Pro Gly Thr Pro Gly Pro Gln Gly Leu

ES 2 812 249 T3

850						855										860
Leu Gly Ala Pro Gly Phe Leu Gly Leu Pro Gly Ser Arg Gly Glu Arg																
865						870										880
Gly Leu Pro Gly Val Ala Gly Ser Val Gly Glu Pro Gly Pro Leu Gly																
				885					890							895
Ile Ala Gly Pro Pro Gly Ala Arg Gly Pro Pro Gly Asn Val Gly Asn																
			900					905						910		
Pro Gly Val Asn Gly Ala Pro Gly Glu Ala Gly Arg Asp Gly Asn Pro																
		915						920					925			
Gly Asn Asp Gly Pro Pro Gly Arg Asp Gly Gln Pro Gly His Lys Gly																
		930					935						940			
Glu Arg Gly Tyr Pro Gly Asn Ala Gly Pro Val Gly Ala Ala Gly Ala																
		945				950						955				960
Pro Gly Pro Gln Gly Pro Val Gly Pro Val Gly Lys His Gly Asn Arg																
				965					970							975
Gly Glu Pro Gly Pro Ala Gly Ala Val Gly Pro Ala Gly Ala Val Gly																
				980					985							990
Pro Arg Gly Pro Ser Gly Pro Gln Gly Ile Arg Gly Asp Lys Gly Glu																
				995				1000						1005		
Pro Gly Asp Lys Gly Pro Arg Gly Leu Pro Gly Leu Lys Gly His																
		1010						1015						1020		
Asn Gly Leu Gln Gly Leu Pro Gly Leu Ala Gly His His Gly Asp																
		1025						1030						1035		
Gln Gly Ala Pro Gly Ala Val Gly Pro Ala Gly Pro Arg Gly Pro																
		1040						1045						1050		
Ala Gly Pro Ser Gly Pro Ala Gly Lys Asp Gly Arg Ile Gly Gln																
		1055						1060						1065		
Pro Gly Ala Val Gly Pro Ala Gly Ile Arg Gly Ser Gln Gly Ser																
		1070						1075						1080		
Gln Gly Pro Ala Gly Pro Pro Gly Pro Pro Gly Pro Pro Gly Pro																
		1085						1090						1095		

ES 2 812 249 T3

Pro Gly Pro Ser Gly Gly Gly Tyr Glu Phe Gly Phe Asp Gly Asp  
1100 1105 1110

Phe Tyr Arg Ala Asp Gln Pro Arg Ser Pro Thr Ser Leu Arg Pro  
1115 1120 1125

Lys Asp Tyr Glu Val Asp Ala Thr Leu Lys Ser Leu Asn Asn Gln  
1130 1135 1140

Ile Glu Thr Leu Leu Thr Pro Glu Gly Ser Arg Lys Asn Pro Ala  
1145 1150 1155

Arg Thr Cys Arg Asp Leu Arg Leu Ser His Pro Glu Trp Ser Ser  
1160 1165 1170

Gly Tyr Tyr Trp Ile Asp Pro Asn Gln Gly Cys Thr Met Asp Ala  
1175 1180 1185

Ile Lys Val Tyr Cys Asp Phe Ser Thr Gly Glu Thr Cys Ile Arg  
1190 1195 1200

Ala Gln Pro Glu Asp Ile Pro Val Lys Asn Trp Tyr Arg Asn Ser  
1205 1210 1215

Lys Ala Lys Lys His Val Trp Val Gly Glu Thr Ile Asn Gly Gly  
1220 1225 1230

Thr Gln Phe Glu Tyr Asn Val Glu Gly Val Thr Thr Lys Glu Met  
1235 1240 1245

Ala Thr Gln Leu Ala Phe Met Arg Leu Leu Ala Asn His Ala Ser  
1250 1255 1260

Gln Asn Ile Thr Tyr His Cys Lys Asn Ser Ile Ala Tyr Met Asp  
1265 1270 1275

Glu Glu Thr Gly Asn Leu Lys Lys Ala Val Ile Leu Gln Gly Ser  
1280 1285 1290

Asn Asp Val Glu Leu Val Ala Glu Gly Asn Ser Arg Phe Thr Tyr  
1295 1300 1305

Thr Val Leu Val Asp Gly Cys Ser Lys Lys Thr Asn Glu Trp Gln  
1310 1315 1320

Lys Thr Ile Ile Glu Tyr Lys Thr Asn Lys Pro Ser Arg Leu Pro  
1325 1330 1335

ES 2 812 249 T3

Ile Leu Asp Ile Ala Pro Leu Asp Ile Gly Gly Ala Asp Gln Glu  
 1340 1345 1350

Ile Arg Leu Asn Ile Gly Pro Val Cys Phe Lys  
 1355 1360

<210> 3  
 <211> 1466  
 <212> PRT  
 <213> *Bos taurus*

<220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <222> (1).. (1466)  
 <223> precursor de cadena de colágeno alfa-1(III)

<400> 3

Met Met Ser Phe Val Gln Lys Gly Thr Trp Leu Leu Phe Ala Leu Leu  
 1 5 10 15

His Pro Thr Val Ile Leu Ala Gln Gln Glu Ala Val Asp Gly Gly Cys  
 20 25 30

Ser His Leu Gly Gln Ser Tyr Ala Asp Arg Asp Val Trp Lys Pro Glu  
 35 40 45

Pro Cys Gln Ile Cys Val Cys Asp Ser Gly Ser Val Leu Cys Asp Asp  
 50 55 60

Ile Ile Cys Asp Asp Gln Glu Leu Asp Cys Pro Asn Pro Glu Ile Pro  
 65 70 75 80

Phe Gly Glu Cys Cys Ala Val Cys Pro Gln Pro Pro Thr Ala Pro Thr  
 85 90 95

Arg Pro Pro Asn Gly Gln Gly Pro Gln Gly Pro Lys Gly Asp Pro Gly  
 100 105 110

Pro Pro Gly Ile Pro Gly Arg Asn Gly Asp Pro Gly Pro Pro Gly Ser  
 115 120 125

Pro Gly Ser Pro Gly Ser Pro Gly Pro Pro Gly Ile Cys Glu Ser Cys  
 130 135 140

Pro Thr Gly Gly Gln Asn Tyr Ser Pro Gln Tyr Glu Ala Tyr Asp Val  
 145 150 155 160

Lys Ser Gly Val Ala Gly Gly Gly Ile Ala Gly Tyr Pro Gly Pro Ala

5

10

15

ES 2 812 249 T3

				165						170					175
Gly	Pro	Pro	Gly	Pro	Pro	Gly	Pro	Pro	Gly	Thr	Ser	Gly	His	Pro	Gly
			180					185					190		
Ala	Pro	Gly	Ala	Pro	Gly	Tyr	Gln	Gly	Pro	Pro	Gly	Glu	Pro	Gly	Gln
		195					200					205			
Ala	Gly	Pro	Ala	Gly	Pro	Pro	Gly	Pro	Pro	Gly	Ala	Ile	Gly	Pro	Ser
	210						215				220				
Gly	Pro	Ala	Gly	Lys	Asp	Gly	Glu	Ser	Gly	Arg	Pro	Gly	Arg	Pro	Gly
225					230					235					240
Glu	Arg	Gly	Phe	Pro	Gly	Pro	Pro	Gly	Met	Lys	Gly	Pro	Ala	Gly	Met
				245					250					255	
Pro	Gly	Phe	Pro	Gly	Met	Lys	Gly	His	Arg	Gly	Phe	Asp	Gly	Arg	Asn
			260					265					270		
Gly	Glu	Lys	Gly	Glu	Thr	Gly	Ala	Pro	Gly	Leu	Lys	Gly	Glu	Asn	Gly
		275					280					285			
Val	Pro	Gly	Glu	Asn	Gly	Ala	Pro	Gly	Pro	Met	Gly	Pro	Arg	Gly	Ala
	290					295					300				
Pro	Gly	Glu	Arg	Gly	Arg	Pro	Gly	Leu	Pro	Gly	Ala	Ala	Gly	Ala	Arg
305					310					315					320
Gly	Asn	Asp	Gly	Ala	Arg	Gly	Ser	Asp	Gly	Gln	Pro	Gly	Pro	Pro	Gly
				325					330						335
Pro	Pro	Gly	Thr	Ala	Gly	Phe	Pro	Gly	Ser	Pro	Gly	Ala	Lys	Gly	Glu
			340					345					350		
Val	Gly	Pro	Ala	Gly	Ser	Pro	Gly	Ser	Ser	Gly	Ala	Pro	Gly	Gln	Arg
		355					360					365			
Gly	Glu	Pro	Gly	Pro	Gln	Gly	His	Ala	Gly	Ala	Pro	Gly	Pro	Pro	Gly
	370					375					380				
Pro	Pro	Gly	Ser	Asn	Gly	Ser	Pro	Gly	Gly	Lys	Gly	Glu	Met	Gly	Pro
385					390					395					400
Ala	Gly	Ile	Pro	Gly	Ala	Pro	Gly	Leu	Ile	Gly	Ala	Arg	Gly	Pro	Pro
				405					410					415	

ES 2 812 249 T3

Gly Pro Pro Gly Thr Asn Gly Val Pro Gly Gln Arg Gly Ala Ala Gly  
 420 425 430

Glu Pro Gly Lys Asn Gly Ala Lys Gly Asp Pro Gly Pro Arg Gly Glu  
 435 440 445

Arg Gly Glu Ala Gly Ser Pro Gly Ile Ala Gly Pro Lys Gly Glu Asp  
 450 455 460

Gly Lys Asp Gly Ser Pro Gly Glu Pro Gly Ala Asn Gly Leu Pro Gly  
 465 470 475 480

Ala Ala Gly Glu Arg Gly Val Pro Gly Phe Arg Gly Pro Ala Gly Ala  
 485 490 495

Asn Gly Leu Pro Gly Glu Lys Gly Pro Pro Gly Asp Arg Gly Gly Pro  
 500 505 510

Gly Pro Ala Gly Pro Arg Gly Val Ala Gly Glu Pro Gly Arg Asp Gly  
 515 520 525

Leu Pro Gly Gly Pro Gly Leu Arg Gly Ile Pro Gly Ser Pro Gly Gly  
 530 535 540

Pro Gly Ser Asp Gly Lys Pro Gly Pro Pro Gly Ser Gln Gly Glu Thr  
 545 550 555 560

Gly Arg Pro Gly Pro Pro Gly Ser Pro Gly Pro Arg Gly Gln Pro Gly  
 565 570 575

Val Met Gly Phe Pro Gly Pro Lys Gly Asn Asp Gly Ala Pro Gly Lys  
 580 585 590

Asn Gly Glu Arg Gly Gly Pro Gly Gly Pro Gly Pro Gln Gly Pro Ala  
 595 600 605

Gly Lys Asn Gly Glu Thr Gly Pro Gln Gly Pro Pro Gly Pro Thr Gly  
 610 615 620

Pro Ser Gly Asp Lys Gly Asp Thr Gly Pro Pro Gly Pro Gln Gly Leu  
 625 630 635 640

Gln Gly Leu Pro Gly Thr Ser Gly Pro Pro Gly Glu Asn Gly Lys Pro  
 645 650 655

Gly Glu Pro Gly Pro Lys Gly Glu Ala Gly Ala Pro Gly Ile Pro Gly  
 660 665 670

ES 2 812 249 T3

Gly Lys Gly Asp Ser Gly Ala Pro Gly Glu Arg Gly Pro Pro Gly Ala  
675 680 685

Gly Gly Pro Pro Gly Pro Arg Gly Gly Ala Gly Pro Pro Gly Pro Glu  
690 695 700

Gly Gly Lys Gly Ala Ala Gly Pro Pro Gly Pro Pro Gly Ser Ala Gly  
705 710 715 720

Thr Pro Gly Leu Gln Gly Met Pro Gly Glu Arg Gly Gly Pro Gly Gly  
725 730 735

Pro Gly Pro Lys Gly Asp Lys Gly Glu Pro Gly Ser Ser Gly Val Asp  
740 745 750

Gly Ala Pro Gly Lys Asp Gly Pro Arg Gly Pro Thr Gly Pro Ile Gly  
755 760 765

Pro Pro Gly Pro Ala Gly Gln Pro Gly Asp Lys Gly Glu Ser Gly Ala  
770 775 780

Pro Gly Val Pro Gly Ile Ala Gly Pro Arg Gly Gly Pro Gly Glu Arg  
785 790 795 800

Gly Glu Gln Gly Pro Pro Gly Pro Ala Gly Phe Pro Gly Ala Pro Gly  
805 810 815

Gln Asn Gly Glu Pro Gly Ala Lys Gly Glu Arg Gly Ala Pro Gly Glu  
820 825 830

Lys Gly Glu Gly Gly Pro Pro Gly Ala Ala Gly Pro Ala Gly Gly Ser  
835 840 845

Gly Pro Ala Gly Pro Pro Gly Pro Gln Gly Val Lys Gly Glu Arg Gly  
850 855 860

Ser Pro Gly Gly Pro Gly Ala Ala Gly Phe Pro Gly Gly Arg Gly Pro  
865 870 875 880

Pro Gly Pro Pro Gly Ser Asn Gly Asn Pro Gly Pro Pro Gly Ser Ser  
885 890 895

Gly Ala Pro Gly Lys Asp Gly Pro Pro Gly Pro Pro Gly Ser Asn Gly  
900 905 910

Ala Pro Gly Ser Pro Gly Ile Ser Gly Pro Lys Gly Asp Ser Gly Pro  
915 920 925

ES 2 812 249 T3

Pro Gly Glu Arg Gly Ala Pro Gly Pro Gln Gly Pro Pro Gly Ala Pro  
930 935 940

Gly Pro Leu Gly Ile Ala Gly Leu Thr Gly Ala Arg Gly Leu Ala Gly  
945 950 955 960

Pro Pro Gly Met Pro Gly Ala Arg Gly Ser Pro Gly Pro Gln Gly Ile  
965 970 975

Lys Gly Glu Asn Gly Lys Pro Gly Pro Ser Gly Gln Asn Gly Glu Arg  
980 985 990

Gly Pro Pro Gly Pro Gln Gly Leu Pro Gly Leu Ala Gly Thr Ala Gly  
995 1000 1005

Glu Pro Gly Arg Asp Gly Asn Pro Gly Ser Asp Gly Leu Pro Gly  
1010 1015 1020

Arg Asp Gly Ala Pro Gly Ala Lys Gly Asp Arg Gly Glu Asn Gly  
1025 1030 1035

Ser Pro Gly Ala Pro Gly Ala Pro Gly His Pro Gly Pro Pro Gly  
1040 1045 1050

Pro Val Gly Pro Ala Gly Lys Ser Gly Asp Arg Gly Glu Thr Gly  
1055 1060 1065

Pro Ala Gly Pro Ser Gly Ala Pro Gly Pro Ala Gly Ser Arg Gly  
1070 1075 1080

Pro Pro Gly Pro Gln Gly Pro Arg Gly Asp Lys Gly Glu Thr Gly  
1085 1090 1095

Glu Arg Gly Ala Met Gly Ile Lys Gly His Arg Gly Phe Pro Gly  
1100 1105 1110

Asn Pro Gly Ala Pro Gly Ser Pro Gly Pro Ala Gly His Gln Gly  
1115 1120 1125

Ala Val Gly Ser Pro Gly Pro Ala Gly Pro Arg Gly Pro Val Gly  
1130 1135 1140

Pro Ser Gly Pro Pro Gly Lys Asp Gly Ala Ser Gly His Pro Gly  
1145 1150 1155

Pro Ile Gly Pro Pro Gly Pro Arg Gly Asn Arg Gly Glu Arg Gly

ES 2 812 249 T3

1160						1165						1170			
Ser	Glu	Gly	Ser	Pro	Gly	His	Pro	Gly	Gln	Pro	Gly	Pro	Pro	Gly	
1175						1180						1185			
Pro	Pro	Gly	Ala	Pro	Gly	Pro	Cys	Cys	Gly	Ala	Gly	Gly	Val	Ala	
1190						1195						1200			
Ala	Ile	Ala	Gly	Val	Gly	Ala	Glu	Lys	Ala	Gly	Gly	Phe	Ala	Pro	
1205						1210						1215			
Tyr	Tyr	Gly	Asp	Glu	Pro	Ile	Asp	Phe	Lys	Ile	Asn	Thr	Asp	Glu	
1220						1225						1230			
Ile	Met	Thr	Ser	Leu	Lys	Ser	Val	Asn	Gly	Gln	Ile	Glu	Ser	Leu	
1235						1240						1245			
Ile	Ser	Pro	Asp	Gly	Ser	Arg	Lys	Asn	Pro	Ala	Arg	Asn	Cys	Arg	
1250						1255						1260			
Asp	Leu	Lys	Phe	Cys	His	Pro	Glu	Leu	Gln	Ser	Gly	Glu	Tyr	Trp	
1265						1270						1275			
Val	Asp	Pro	Asn	Gln	Gly	Cys	Lys	Leu	Asp	Ala	Ile	Lys	Val	Tyr	
1280						1285						1290			
Cys	Asn	Met	Glu	Thr	Gly	Glu	Thr	Cys	Ile	Ser	Ala	Ser	Pro	Leu	
1295						1300						1305			
Thr	Ile	Pro	Gln	Lys	Asn	Trp	Trp	Thr	Asp	Ser	Gly	Ala	Glu	Lys	
1310						1315						1320			
Lys	His	Val	Trp	Phe	Gly	Glu	Ser	Met	Glu	Gly	Gly	Phe	Gln	Phe	
1325						1330						1335			
Ser	Tyr	Gly	Asn	Pro	Glu	Leu	Pro	Glu	Asp	Val	Leu	Asp	Val	Gln	
1340						1345						1350			
Leu	Ala	Phe	Leu	Arg	Leu	Leu	Ser	Ser	Arg	Ala	Ser	Gln	Asn	Ile	
1355						1360						1365			
Thr	Tyr	His	Cys	Lys	Asn	Ser	Ile	Ala	Tyr	Met	Asp	His	Ala	Ser	
1370						1375						1380			
Gly	Asn	Val	Lys	Lys	Ala	Leu	Lys	Leu	Met	Gly	Ser	Asn	Glu	Gly	
1385						1390						1395			

ES 2 812 249 T3

Glu Phe Lys Ala Glu Gly Asn Ser Lys Phe Thr Tyr Thr Val Leu  
1400 1405 1410

Glu Asp Gly Cys Thr Lys His Thr Gly Glu Trp Gly Lys Thr Val  
1415 1420 1425

Phe Gln Tyr Gln Thr Arg Lys Ala Val Arg Leu Pro Ile Val Asp  
1430 1435 1440

Ile Ala Pro Tyr Asp Ile Gly Gly Pro Asp Gln Glu Phe Gly Ala  
1445 1450 1455

Asp Ile Gly Pro Val Cys Phe Leu  
1460 1465

**REIVINDICACIONES**

1. Un material biofabricado

- 5 (i) que comprende una red de fibrillas de colágeno no humano, en donde menos del 10 % en peso de las fibrillas de colágeno en el material están en forma de fibras de colágeno que tienen un diámetro de 5 µm o más, en forma de fibrillas alineadas para 100 µm o más de sus longitudes, o ambas;
- 10 en donde las fibrillas de colágeno no están ensambladas en haces o fibras; en donde dicho material no contiene más del 40 % en peso de agua; en donde dicho material contiene al menos el 1 % de un lubricante; y en donde dicho material no contiene actina o
- 15 (ii) que comprende una red de fibrillas de colágeno no humano recombinante, en donde el colágeno no contiene hidroxilisina; en donde dicho material no contiene más del 25 % en peso de agua; y en donde dicho material contiene al menos el 1 % de un lubricante.
2. El material de acuerdo con la reivindicación 1, en donde dicho material es (i).
- 20 3. El material de la reivindicación 2, en donde el colágeno es colágeno recombinante que no contiene sustancialmente 3-hidroxiprolina.
4. El material de acuerdo con la reivindicación 1, en donde dicho material es (ii).
- 25 5. El material de acuerdo con la reivindicación 4, en donde menos del 10 % en peso de las fibrillas de colágeno en el material están en forma de fibras de colágeno que tienen un diámetro de 5 µm o más, están en forma de fibrillas alineadas para 100 µm o más de sus longitudes, o ambas.
- 30 6. El material de acuerdo con la reivindicación 1 que tiene unas superficies superior e inferior o unas superficies interna y externa.
7. El material de la reivindicación 1, en donde el colágeno comprende colágeno bovino de Tipo I o de Tipo III.
- 35 8. El material de la reivindicación 1 que sustancialmente no contiene pelo, folículo(s) piloso(s) o grasa animal.
9. El material de la reivindicación 1 que contiene no más del 1 % en peso de queratina, elastina, fibrina, albúmina, globulina, mucina, mucinoides, proteína estructural no de colágeno, y/o proteína no estructural no de colágeno.
- 40 10. El material de acuerdo con la reivindicación 1, en donde los diámetros de las fibrillas en el material presentan una distribución sustancialmente unimodal en donde al menos el 70 % de los diámetros de las fibrillas en el material se distribuyen alrededor de un único modo de diámetro.
- 45 11. El material de acuerdo con la reivindicación 1, en donde el al menos un lubricante se selecciona del grupo que consiste en al menos una grasa, aceite biológico, mineral o sintético, aceite sulfonado, polímero y siloxano organofuncional.
- 50 12. El material de acuerdo con la reivindicación 1, que además comprenden un revestimiento de superficie o un acabado de superficie en donde el revestimiento de superficie o el acabado de superficie se distribuyen de manera uniforme a través del material, de tal manera que su concentración en peso sobre o en volúmenes unitarios idénticos del material varía en no más del 20 %.
- 55 13. El material de acuerdo con la reivindicación 1, que además comprende un colorante, un tinte, una resina, un polímero, un pigmento o una pintura, en donde el colorante, el tinte, la resina, el pigmento o la pintura están distribuidos uniformemente en todo el material, de tal manera que su concentración en peso en o sobre volúmenes unitarios idénticos del material varía en no más del 20 %.
- 60 14. El material de acuerdo con la reivindicación 1, que además comprende al menos una carga; en donde la carga está distribuida de manera uniforme en todo el material, de tal manera que su concentración en peso en o sobre los volúmenes unitarios del material varía en no más del 20 %.

FIG. 1

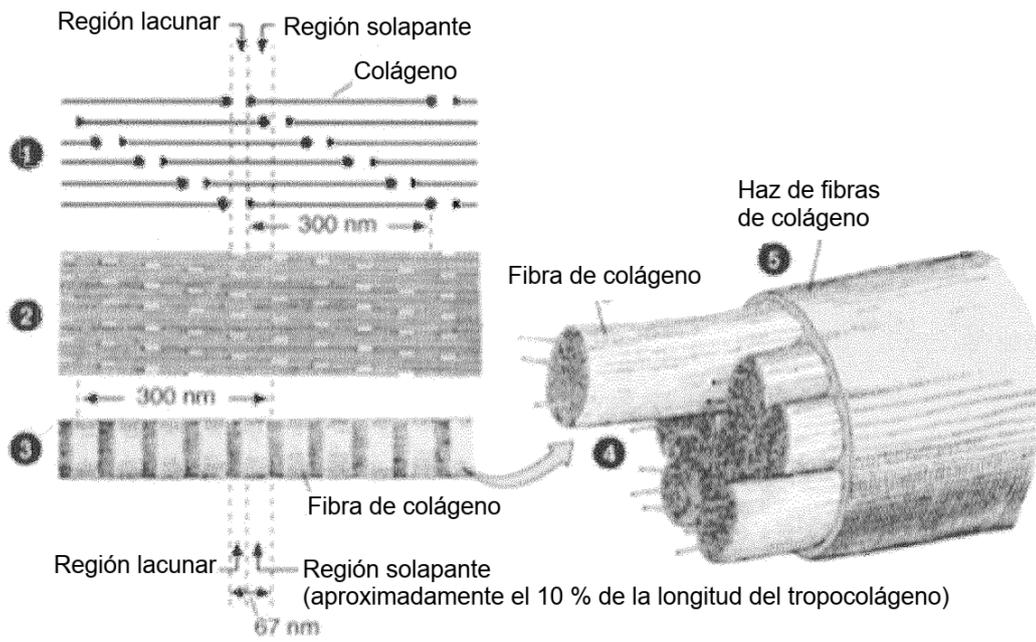
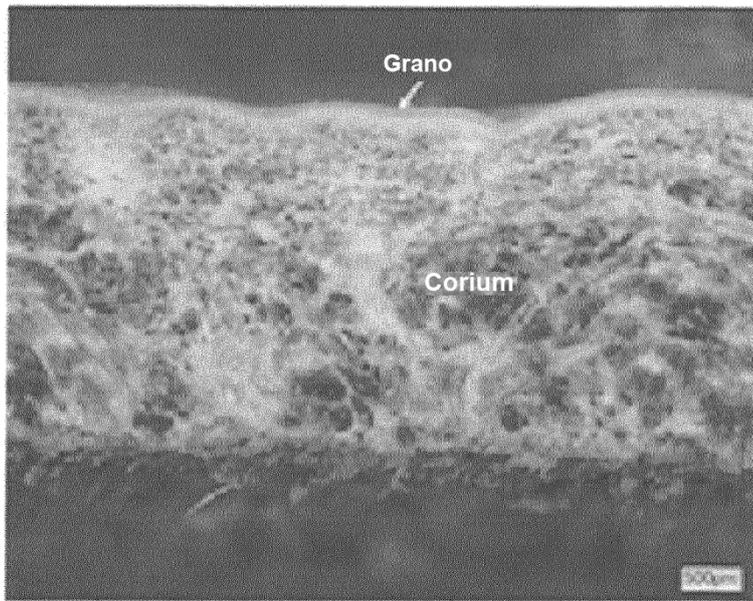
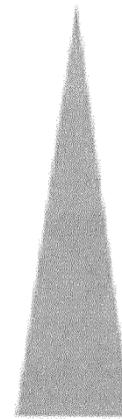


FIG. 2A



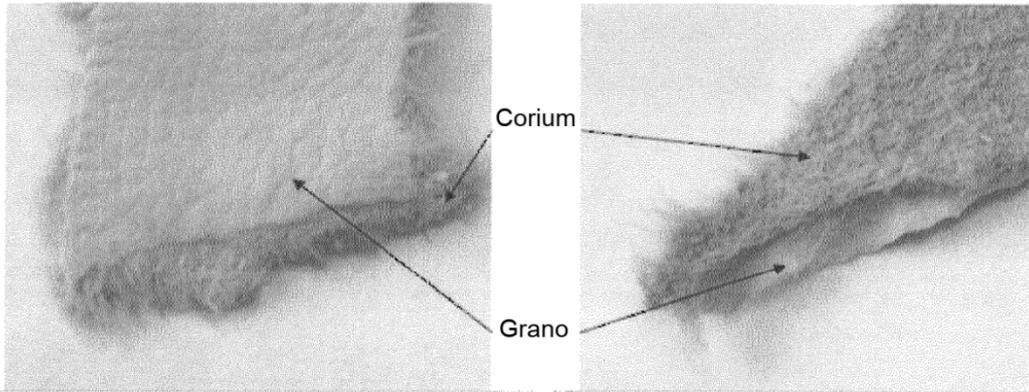
Fibrillas



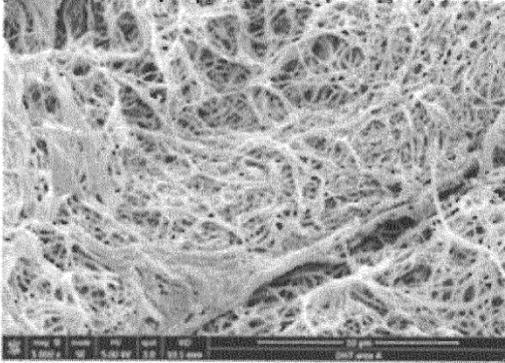
Haces de fibras

FIG. 2B

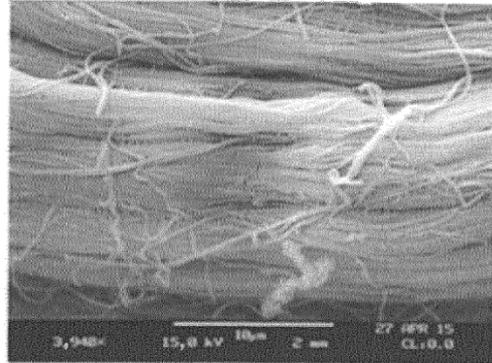
FIG. 2C



**FIG. 3A**



**FIG. 3B**



**FIG. 4**

